



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

Rapporto definitivo sull'attività di ricerca

DGR n. 11 del 5.01.2018

Cod. Ente: 1695
Asse OCCUPABILITA'

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Cod. Progetto: 1695-16-11-2018

Titolo Progetto: "Sviluppo di prodotti a base cioccolato fortificati con composti bioattivi"

Dipartimento: Dipartimento di Biotecnologie (Università degli Studi di Verona)

Responsabile di progetto e Tutor per la Ricerca:
Destinatari:

Prof. Fabio Favati
Dott.ssa Roberta Tolve

Firma del Destinatario

Roberta Tolve

Firma del Responsabile di Progetto e Tutor per la Ricerca

Fabio Favati

Luogo e data

Verona, 14/10/2019



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO



Indice

Definizione del progetto e proposta di lavoro	Pag.	1
Descrizione delle attività svolte	“	3
➤ <i>Selezione del prodotto a base cioccolato da fortificare</i>	“	3
➤ <i>Caratterizzazione della matrice alimentare di partenza e di due referenze affini già presenti sul mercato</i>	“	3
➤ <i>Bioaccessibilità dei composti fenolici e indice di degradazione della matrice</i>	“	9
➤ <i>Valutazione della concentrazione di minerali tramite ICP-MS ice</i>	“	14
➤ <i>Test di shelf-life accelerata (Accelerated Shelf Life Testing - ASLT)</i>	“	15
➤ <i>Analisi sensoriale e accettabilità del prodotto</i>	“	24
➤ <i>Ricerca bibliografica e di mercato finalizzata alla scelta dei composti bioattivi da poter utilizzare per la formulazione di alimenti funzionali</i>	“	25
➤ <i>Reperimento dei possibili fornitori commerciali dei composti bioattivi</i>	“	27
➤ <i>Produzione di nanoparticelle di Mg-CaCO₃</i>	“	27
➤ <i>Messa a punto ed ottimizzazione del processo di microincapsulazione del composto bioattivo di interesse</i>	“	28
➤ <i>Produzione delle microcapsule contenenti vitamina D e rutina</i>	“	29
➤ <i>Estrazione e quantificazione della vitamina D e della rutina</i>	“	31
➤ <i>Prove di fortificazione della crema spalmabile selezionata con la formulazione di tre referenze differenti</i>	“	34
➤ <i>Caratterizzazione delle creme fortificate</i>	“	35
➤ <i>Bioaccessibilità dei composti fenolici e indice di degradazione della matrice</i>	“	37
➤ <i>Concentrazione dei minerali</i>	“	39
➤ <i>Test di shelf-life accelerata (Accelerated Shelf Life Testing - ASLT)</i>	“	40
➤ <i>Analisi sensoriale e accettabilità del prodotto</i>	“	44
Conclusioni	“	47
Bibliografia	“	49
Allegati	“	53



Definizione del progetto e proposta di lavoro

La presente relazione riporta le attività svolte per la realizzazione del progetto “Sviluppo di prodotti a base cioccolato fortificati con composti bioattivi – Realizzazione di prodotti a base cioccolato fortificati con composti bioattivi per il miglioramento della salute e benessere dei consumatori”, finanziato dalla Regione Veneto – Fondo Sociale Europeo in sinergia con il Fondo Europeo di Sviluppo Regionale POR 2014-2020, Obiettivo “Investimenti a favore della crescita e dell’occupazione” – Asse I Occupabilità – “La ricerca a sostegno della trasformazione aziendale – Innovatori in azienda”, CUP B34J18000130002.

Il progetto nasce dalla necessità, manifestata negli ultimi anni dalle aziende operanti nel settore alimentare, di ampliare la propria offerta produttiva con referenze innovative aventi una specifica attrattiva da un punto di vista nutrizionale.

Il progetto ha avuto come partner industriale la società dolciaria Socado s.r.l. la quale, mettendo a disposizione le conoscenze e le competenze del proprio personale della sezione Ricerca & Sviluppo, le materie prime e gli impianti per la produzione delle campionature ha contribuito alla realizzazione dello stesso. La riuscita del progetto è stata anche agevolata dal partenariato interregionale con l’Università degli Studi della Basilicata e, nello specifico, con la referente del partenariato la Prof.ssa Fernanda Galgano. La collaborazione con il gruppo di tecnologie alimentari dell’Università della Basilicata ha consentito la messa a punto di protocolli relativi alla microincapsulazione dei composti bioattivi. Inoltre, per il raggiungimento degli obiettivi fissati nel presente progetto si è resa necessaria la collaborazione con un esperto straniero di riconosciuta qualificazione scientifica, identificato nella figura della Prof.ssa Fideline Laure Tchuenbou-Magaia, Professore Associato di ingegneria chimica presso la Scuola di Ingegneria dell’Università di Wolverhampton, da anni impegnata nello sviluppo di alimenti funzionali, nella conservazione e nella stabilizzazione di composti bioattivi. La Prof.ssa Fideline Tchuenbou-Magaia, durante la sua permanenza presso l’Università di Verona, ha contribuito alla messa a punto ed all’ottimizzazione dei protocolli utilizzati per la formulazione e per la valutazione chimico-fisico sensoriale dei campioni di cioccolato spalmabile.

L’ulteriore presenza di un esperto in analisi chimiche, fisiche e sensoriali dei prodotti alimentari ha permesso sia l’implementazione che lo svolgimento delle analisi chimiche, fisiche e sensoriali.

La presente proposta progettuale ha avuto come obiettivo lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali a



base cioccolato passando attraverso le fasi di progettazione, formulazione, caratterizzazione ed ottimizzazione di prodotto. L'obiettivo è stato raggiunto attraverso la realizzazione delle seguenti attività:

- selezione, sulla base delle esigenze del partner aziendale, del prodotto a base cioccolato da fortificare;
- caratterizzazione chimico-fisico sensoriale della matrice alimentare di partenza e di due referenze affini già presenti sul mercato;
- ricerca bibliografica e di mercato finalizzata alla scelta dei composti bioattivi da poter utilizzare per la formulazione di alimenti funzionali;
- reperimento dei possibili fornitori commerciali dei composti bioattivi;
- messa a punto ed ottimizzazione del processo di microincapsulazione di Vitamina D;
- prove di fortificazione della crema spalmabile con la formulazione di tre referenze differenti:
 - Crema alla nocciola fortificata con sola Vitamina D
 - Crema alla nocciola fortificata con solo Mg-CaCO₃
 - Crema alla nocciola fortificata con Vitamina D e Mg-CaCO₃
- caratterizzazione chimico-fisico sensoriale delle formulazioni ottenute

Descrizione delle attività svolte

Selezione del prodotto a base cioccolato da fortificare

La Socado srl, Società Alimentare Dolciaria che opera nel mondo del cioccolato fin dall'inizio degli anni '70, ha impianti moderni e tecnologicamente avanzati dedicati alla produzione di un'ampia gamma di prodotti: praline in buste e confezioni regalo, tavolette di cioccolato, semilavorati e prodotti a base di cioccolato per l'industria dolciaria, prodotti da ricorrenza e soprattutto creme spalmabili.

Attualmente il mercato dei prodotti a base cioccolato si presenta in una fase stazionaria, in cui l'eventuale crescita è collegata all'introduzione di nuovi prodotti che apportino significativi elementi di innovazione per il consumatore, anche da un punto di vista nutrizionale. A questo riguardo c'è un crescente interesse nel mercato alimentare verso prodotti che, al di là delle specifiche composizioni, siano formulati con l'aggiunta di sostanze che possano rendere l'alimento un "alimento funzionale". Tenendo presente questo aspetto e considerando anche gli obiettivi commerciali del partner aziendale, si è concordato nell'orientare l'attività di ricerca verso lo sviluppo di una crema spalmabile alla nocciola caratterizzata dalla introduzione nella formulazione di composti bioattivi, per rendere tale prodotto più "appetibile" per il consumatore.

Per evitare di stravolgere completamente l'assetto delle linee di produzione presenti in Socado, si è convenuto di andare a investigare il processo di fortificazione utilizzando una delle referenze già prodotte dalla ditta, e fra queste, considerando anche altre richieste di mercato, si è scelto di operare su un prototipo di crema spalmabile alla nocciola messo a punto dalla stessa Socado, realizzato senza olio di palma e senza zuccheri, denominato commercialmente "Come tu mi vuoi".

Caratterizzazione della matrice alimentare di partenza e di due referenze affini già presenti sul mercato

La crema spalmabile alla nocciola "Come tu mi vuoi" è stata caratterizzata dal punto di vista chimico-fisico e sensoriale ed è stata confrontata con due prodotti analoghi, ma non identici, già presenti sul mercato: la Dolcrem (Socado Srl) e la Nutella (Ferrero SpA).

Delle tre tipologie di creme spalmabili si riporta di seguito la lista degli ingredienti, mentre i relativi valori nutrizionali sono riportati in Tabella 1:

➤ *Nutella*

zucchero, olio di palma, nocciole (13%), latte scremato in polvere (8,7%), cacao magro (7,4%)

emulsionanti: lecitine (soia), vanillina.

➤ DolCrem

zuccheri, olii vegetali (girasole e karitè) nocciole (13%), latte scremato in polvere, cacao magro in polvere, siero di latte in polvere, lattosio, emulsionante: lecitina di soia, aroma (vanillina).

➤ Come tu mi vuoi

edulcorante: maltitolo, olio di semi di girasole, nocciole (13%), latte scremato in polvere, siero di latte in polvere, inulina, cacao magro in polvere, burro di cacao, emulsionanti: lecitine (girasole), estratto di vaniglia.

Dalla Tabella 1 si evidenzia come la Dolcrem differisca dalla Nutella, la crema spalmabile al cacao e nocciole più famosa nel mondo occidentale, soprattutto in termini di tipologia di grassi utilizzati (gli altri ingredienti risultano simili, ma presenti in percentuali diverse). Infatti, mentre nella Nutella è presente l'olio di pama, nella DolCrem è stata utilizzata una miscela di grassi saturi (olio di karitè) e insaturi (olio di girasole). La crema spalmabile “Come tu mi vuoi”, oltre che per la tipologia di grasso (è presente solamente l'olio di girasole) differisce sostanzialmente per l'assenza dello zucchero e per la presenza del maltitolo e dell'inulina.

Tabella 1. Valore nutrizionale delle creme spalmabili per 100 g di prodotto.

	Nutella	DolCrem	Come tu mi vuoi
Energia	2252 KJ 539 Kcal	2223 KJ 532 Kcal	2074 KJ 501 Kcal
Grassi di cui acidi saturi	30,9 g 10,6 g	30 g 5,2 g	36 g 6,5 g
Carboidrati di cui zuccheri	57,5 g 56,3 g	58 g 56 g	45 g 13 g
Polioli	-	-	30 g
Fibre	-	-	9,8 g
Proteine	6,3 g	6,1 g	6,4 g
Sale	0,11 g	0,08 g	0,14 g

La natura del grasso che si sceglie per la formulazione di una crema spalmabile è fondamentale sia

per definire le condizioni di lavorazione che per le caratteristiche chimico-fisiche sensoriali del prodotto finale. Infatti, dal tipo e dalla quantità del grasso utilizzato dipendono alcune delle caratteristiche fondamentali delle creme, come la capacità di sciogliersi in bocca, la morbidezza, la granulosità, la texture e la consistenza (Ribeiro et al., 2009). I grassi sono anche i principali responsabili di alcuni dei problemi tecnologici che si incontrano durante la produzione di una crema spalmabile, in particolare il *fat bloom* ovvero l'affioramento del grasso sulla superficie del prodotto (Talbot, 2009). La composizione in acidi grassi dei grassi vegetali usati in queste tre formulazioni è riportata in Tabella 2.

L'olio di palma è uno dei grassi più utilizzati nelle formulazioni alimentari tuttavia, ognidì, a causa di controversie dal punto di vista ecologico, socio-economico e mediatico, molte aziende alimentari stanno cercando di lanciare sul mercato prodotti “*palma free*”.

Nell'etichetta della crema spalmabile “Come tu mi vuoi” risulta essere completamente assente lo zucchero a favore di un poliolo, il maltitolo. La funzione principale dello zucchero nelle creme spalmabili è quella di dare dolcezza alla preparazione, oltre che fornire struttura e consistenza. Solitamente viene utilizzato zucchero di canna bianco raffinato, il quale però durante il processo di lavorazione delle creme deve subire un processo di ulteriore raffinazione, affinché le sue particelle diminuiscano di dimensione per poter dare origine ad un prodotto omogeneo e non granuloso. Va sottolineato come particelle aventi un diametro superiore ai 300 µm diano una sensazione di sabbiosità ai prodotti, cosa per cui il processo di raffinazione si deve spingere fino a ridurre le dimensioni di tutti gli ingredienti al di sotto di tale valore.

Tabella 2. Composizione acidica media dei grassi utilizzati nelle creme spalmabili Nutella, Dolcrem e “Come tu mi vuoi”.

	Palma	Karitè	Girasole
Ac. palmitico (%)	39,3-47,5	3,3-7,5	6-7
Ac. stearico (%)	3,5-6,0	29,5-55,7	4-5,6
Ac. oleico (%)	36,0-44,5	37,2-60,7	20-30
Ac. linoleico (%)	9,0-12,5	4,3-8,0	60-62
Altri ac. grassi minori (%)	0,3	-	0-5

Negli ultimi anni la preoccupazione dei consumatori riguardo i possibili effetti negativi dello zucchero sulla salute e sul benessere, ha incrementato sempre più la popolarità dei prodotti “*sugar-*

“free”. Al momento, le alternative che sembrano essere più adatte sono quelle che prevedono l’utilizzo di dolcificanti nutritivi o non nutritivi. I primi sono ingredienti che sostituiscono completamente lo zucchero, sia per dolcezza che per voluminosità e a questa categoria appartengono i polioli e i carboidrati non digeribili. I dolcificanti non-nutritivi, al contrario, sono sostanze che presentano un gusto dolce molto intenso e per questo vengono usati in piccole quantità. Essi hanno solo l’effetto di rimpiazzare la dolcezza dello zucchero; per tale motivo, è necessario associare un secondo ingrediente che funga da agente di riempimento, per rimpiazzare la massa persa dalla rimozione zucchero (Aidoo et al, 2013).

I polioli, prodotti tradizionalmente a partire dallo sciroppo di mais, non vengono completamente digeriti, e ciò determina uno dei principali svantaggi legati al loro utilizzo, l’effetto lassativo. Questo si determina perché a livello intestinale la presenza di tali composti provoca una variazione della pressione osmotica ed il conseguente richiamo di una notevole quantità di acqua nel lume intestinale. Peraltro l’intensità di tale fenomeno avverso varia a seconda del tipo e della quantità di dolcificante assunto e per legge nei prodotti alimentari contenenti tali ingredienti deve essere riportata in etichetta la dicitura “*un consumo eccessivo può causare effetti lassativi*”.

Il maltitolo, un poliolo che deriva dallo sciroppo di glucosio, presenta una dolcezza pari al 95% rispetto a quella del saccarosio. È un ingrediente poco igroscopico e per questo motivo può essere usato, nella produzione di creme spalmabili, nei processi di raffinazione e di concaggio alle stesse condizioni di processo utilizzate per il saccarosio. La tolleranza media per questo dolcificante risulta essere, secondo alcune osservazioni, di 84 g/giorno (Aidoo et al, 2013).

L’inulina appartiene invece alla classe dei fruttani ed è un polimero lineare o ramificato di fruttosio e la principale fonte di inulina utilizzata nell’industria alimentare è la cicoria. L’inulina è inoltre considerata un ingrediente funzionale, dato che la sua assunzione ha effetti benefici sulla salute. L’inulina mostra anche un certo grado di dolcezza e, a differenza di altre tipologie di fibra, non presenta alcun *off-flavor* e non determina modificazioni della viscosità dei prodotti in cui viene inserita. Grazie a queste sue qualità, l’inulina si presenta come un prodotto adatto per la formulazione di alimenti a ridotto contenuto in zuccheri ed elevato contenuto in fibra, per i quali si desidera mantenere caratteristiche di texture e gusto simili a quelle del prodotto di partenza (Niness, 1999).

Della crema spalmabile oggetto di studio (“Come tu mi vuoi”) e delle due referenze affini già presenti sul mercato (Nutella e Dolcrem) è stata valutata la viscosità, la granulometria, l’umidità, il colore e l’attività dell’acqua ed i risultati sono stati riportati in Tabella 3.



Tabella 3. Caratteristiche e proprietà fisiche delle creme spalmabili Nutella, Docrem e “Come tu mi vuoi”.

Crema spalmabile	Granulometria (Ø mm)	Umidità (%)	a_w	Parametri reologici		Colore		
				Limite di scorrimento (Pa)	Viscosità (mPa s ⁻¹)	L*	a*	b*
Nutella	0,024±0,000 ^a	0,76±0,03 ^a	0,458±0,000 ^a	33,00±0,80 ^a	4775,73 ±73,97 ^a	35,68 ± 1,7 ^{ab}	9,01 ± 0,77 ^a	13,42 ± 1,69 ^a
DolCrem	0,023±0,001 ^a	0,90±0,01 ^b	0,459±0,001 ^a	31,53±0,69 ^b	3195,30±124,54 ^b	32,14± 2,02 ^b	8,62 ± 0,66 ^a	13,44 ± 1,64 ^a
Come tu mi vuoi	0,023±0,000 ^a	1,21±0,09 ^c	0,460±0,003 ^a	14,93±1,39 ^c	2415,07±101,96 ^c	35,82 ± 1,03 ^a	8,78 ±0,40 ^a	14,05 ± 1,16 ^a

L*: luminosità; a*: rosso/verde; b*: giallo/blu

I valori in colonna che presentano apici differenti sono significativamente diversi (p<0,05)

In tutte le creme la granulometria è risultata essere ottimale, in quanto ben al di sotto del limite di 300 µm, soglia di percezione di *granulosità* nel prodotto. Ciò è stato reso possibile dalle operazioni di pre-raffinazione e raffinazione che normalmente vengono condotte in azienda.

Riguardo al tenore in umidità, la crema “Come tu mi vuoi” ha mostrato valori significativamente più elevati rispetto alle altre due referenze. Ciò potrebbe essere imputabile alla diversa igroscopicità dell’inulina e del maltitolo, presenti nella crema sperimentale, rispetto al saccarosio (Konar, 2013; Aidoo et al., 2014). I valori dell’aw delle creme spalmabili sono risultati non significativamente diversi tra di loro e ben al di sotto del valore di 0,6 limite al di sotto del quale le attività metaboliche di molti microrganismi sono inibite.

Dal punto di vista reologico, le proprietà delle creme spalmabili sono influenzate soprattutto dalla particle size distribution (PSD) e dagli ingredienti. Parametri reologici importanti nella produzione di creme spalmabili sono il “limite di scorrimento” e la “viscosità” della crema. Il primo rappresenta la pressione minima da applicare per determinare lo scorrimento del fluido, mentre il secondo è un indice di quanto la natura del fluido determini la dissipazione sotto forma di calore dell’energia di movimento fornita e quindi una maggiore o minore facilità di movimentazione del fluido a parità di sollecitazione applicata.

I valori più elevati di limite di scorrimento e di viscosità sono stati osservati nella Nutella. Ciò è ascrivibile sia all’utilizzo come ingrediente dell’olio di palma, semi-solido a temperatura ambiente, sia all’utilizzo del saccarosio che, grazie alla sua struttura facilita le interazioni tra le particelle solide del cioccolato. Andando a sostituire in parte il grasso saturo presente nella Nutella con l’olio di girasole, come avviene nella crema Dolcrem, si ottiene una riduzione dei parametri reologici. Nella crema “Come tu mi vuoi”, in cui il saccarosio è stato sostituito con l’inulina ed il maltitolo, si osserva una maggiore e significativa riduzione dei parametri reologici. L’inulina è formata da catene di monomeri di fruttosio di diversa lunghezza e con diverse ramificazioni che, in un sistema complesso come quello delle creme spalmabili, si interpongono tra le particelle solide, diminuendone le interazioni e dando così origine ad una matrice meno strutturata. Come conseguenza si osserva una riduzione del limite di scorrimento. E’ inoltre da evidenziare come in presenza di inulina la viscosità della crema risulti essere significativamente minore, dato che tale polimero agisce come lubrificante, poiché le sue ramificazioni creano delle vie preferenziali all’interno delle quali si disperde in modo omogeneo la fase grassa (Aidoo et al., 2013; Furlán et al., 2017).

Riguardo al colore, questo è stato valutato usando lo spazio colore Lab ovvero uno spazio colore-

opponente che si sviluppa in 3 dimensioni con la dimensione L* per la luminosità e a* e b* per la crominanza ovvero le dimensioni colore-opponente che vanno rispettivamente dal rosso al verde e dal giallo al blu e possono avere valori compresi tra +100 e – 100. Come si evince dalla Tabella 3, le tre formulazioni in esame non risultano essere diverse per i valori di a* e b*, mentre una leggera maggiore luminosità è stata rilevata per la crema “Come tu mi vuoi”.

Bioaccessibilità dei composti fenolici e indice di degradazione della matrice

I composti fenolici sono composti bioattivi non nutritivi molto importanti per la salute dell’essere umano grazie alla loro capacità di proteggere l’organismo da malattie neurodegenerative e coronariche e da neoplasie (Racolta et al., 2014). La concentrazione di polifenoli nelle creme spalmabili oggetto di studio è riportata in Figura 1.

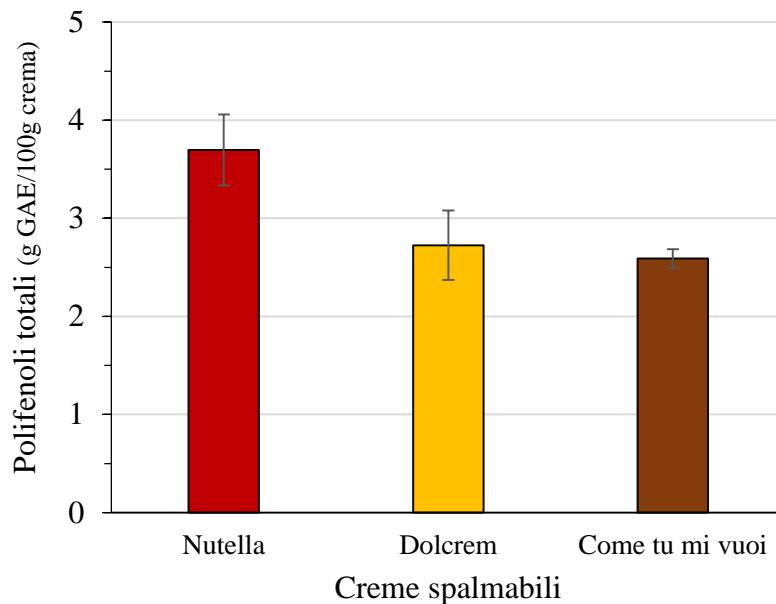


Figura 1. Concentrazione di polifenoli totali nelle varie creme spalmabili.

Tuttavia per stabilire se i composti fenolici presentino un ruolo positivo per la salute dell’uomo, è necessario in prima istanza determinare la loro biodisponibilità (persistenza della molecola, o delle forme originate dal suo metabolismo a livello epatico, nel plasma). La biodisponibilità è definita come la percentuale del contenuto totale di un componente dell’alimento che viene assorbita e successivamente utilizzata dall’organismo per le sue specifiche funzioni, eventualmente dopo essere stata convertita in forma attiva (Ross, 2014). La biodisponibilità dipende dalla bioaccessibilità, cioè

dal contenuto del composto d'interesse che è rilasciato dalla matrice alimentare nel tratto gastrointestinale (Rubio et al., 2014). La bioaccessibilità è fortemente influenzata dalle proprietà fisico-chimiche della matrice (composizione, viscosità, solubilità, pH) e dai processi tecnologici usati nella produzione dell'alimento, oltre che dalle condizioni fisiologiche dell'individuo.

I polifenoli generalmente sono parzialmente assorbiti, largamente metabolizzati e rapidamente eliminati. Hanno una differente densità strutturale che influenza la loro biodisponibilità e gli isoflavoni e acidi fenolici come il caffeoico e il gallico sono quelli più assorbiti (Manach et al., 2004). Dal momento che la maggior parte dei composti è presente negli alimenti come esteri, glucosidi (glicone-parte glucidica e aglicone-parte non glucidica) o polimeri che non possono essere assorbiti nella loro forma originaria, devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali o dalla microflora del colon, che consente una rapida ed elevata deglicosilazione. L'assorbimento a livello gastrico è invece limitato sia per la ridotta area di scambio, confrontata a quella dell'intestino, sia per la resistenza all'idrolisi dovuta al pH e agli enzimi gastrici. Al fine di poter dunque valutare la bioaccessibilità dei composti fenolici, le tre creme spalmabili sono state sottoposte al processo di digestione *in vitro*, il che ha inoltre permesso di valutare la degradazione della matrice alimentare durante il processo digestivo. La digestione simulata *in vitro* è un processo ampiamente utilizzato per studiare il comportamento gastrointestinale di alimenti o prodotti farmaceutici. Questo procedimento permette di mimare le condizioni di digestione *in vivo*, tenendo conto della presenza di enzimi digestivi e delle loro concentrazioni, del pH, dei tempi di digestione e delle concentrazioni dei sali. A tale scopo sono stati fatti dei prelievi del digestato nelle diverse fasi di digestione e su questi campionamenti è stata effettuata la determinazione del tenore fenolico. Il protocollo utilizzato per l'esecuzione delle digestioni *in vitro* è quello proposto da Minekus et al. (2014) che consta delle seguenti fasi:

Fase orale

2,5 g di cioccolato sono stati mescolati con 1,75 ml di SSF (Simulated Salivary Fluid) (Tab. 4) e 0,25 ml di α -amilasi salivare (stock 1500 U ml⁻¹ in SSF, Sigma Aldrich srl Milano). Sono stati poi aggiunti 12,5 μ l di CaCl₂ 3 M e 487,5 μ l di acqua. Il primo prelievo di 1,5 ml è stato effettuato una volta trascorsi due minuti, tempo impiegato per ridurre il cibo a bolo alimentare. Il campione prelevato è stato posto in una provetta contenente 1,5 ml di metanolo e portato a -20° C al fine di inibire l'attività dell'amilasi.

Fase gastrica

Ai 3,5 ml di campione derivante dalla fase salivare sono stati poi aggiunti 2,53 ml di SGF (Simulated Gastric Fluid), 1,12 ml di pepsina (stock 25000 U ml⁻¹ in SGF, Sigma Aldrich srl Milano), 1,75 µl di CaCl₂ 0,3 M, 243,25 µl di acqua. Il pH della soluzione è stato quindi aggiustato a 3 con HCl 1M ed il campione è stato incubato per 2 h a 37 °C. Ogni 30 min il pH è stato portato a 3 e, dopo le due ore di incubazione, 1,5 ml di campione sono stati prelevati e posti in una provetta contenente 1,5 ml di metanolo. Al fine di inibire l'attività della pepsina, il campione è stato posto a -20° C.

Fase intestinale

Ai 5,5 ml di campione derivante dalla fase gastrica sono stati aggiunti 3 ml di SIF (Simulated Intestinal Fluid), 0,687 ml di pancreatina (stock 800 U ml⁻¹ in SIF, Sigma Aldrich srl Milano) e 0,687 ml di lipasi (stock 2000 U ml⁻¹, Sigma Aldrich srl Milano), 0,69 ml di sali di bile, 12 µl di CaCl₂, 0,3 M, 360 µl di acqua. In questa fase il pH è stato aggiustato a 7 con NaOH 1M ed il campione è stato incubato per 3 h a 37 °C. Ogni 30 min il pH è stato portato a 7 e, dopo le tre ore di incubazione, 1,5 ml di campione sono stati prelevati e posti in una provetta contenente 1,5 ml di metanolo. Al fine di inibire l'attività della pancreatina e della lipasi, il campione è stato posto a -20 °C.

Tabella 4. Composizione delle soluzioni salivare (SSF), gastrica (SGF) ed intestinale (SIF) utilizzate per il processo di digestione *in vitro*.

Salì utilizzati	SSF (mmol/l)	SGF (mmol/l)	SIF (mmol/l)
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25,0	85,0
NaCl	--	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,06	0,5	--

In Figura 2 è riportata la concentrazione dei polifenoli così come osservata nella fase salivare, gastrica ed intestinale del processo di digestione *in vitro* delle tre creme spalmabili. Per tutte e tre i prodotti si osserva il medesimo andamento, con una elevata concentrazione di polifenoli nella fase salivare seguita da un decremento nella fase gastrica e da un successivo aumento nella fase intestinale. La riduzione dei polifenoli totali sembrerebbe seguire l'andamento del pH con una forte riduzione durante la fase gastrica, seguita da un aumento nell'ambiente neutro-debolmente basico presente nell'intestino. Tale andamento è stato già riportato da altri autori dato che le sostanze fenoliche presenterebbero una maggiore resistenza alla destrutturazione nell'ambiente gastrico (Saura-Calixto et al., 2007; Tagliazucchi et al., 2010).

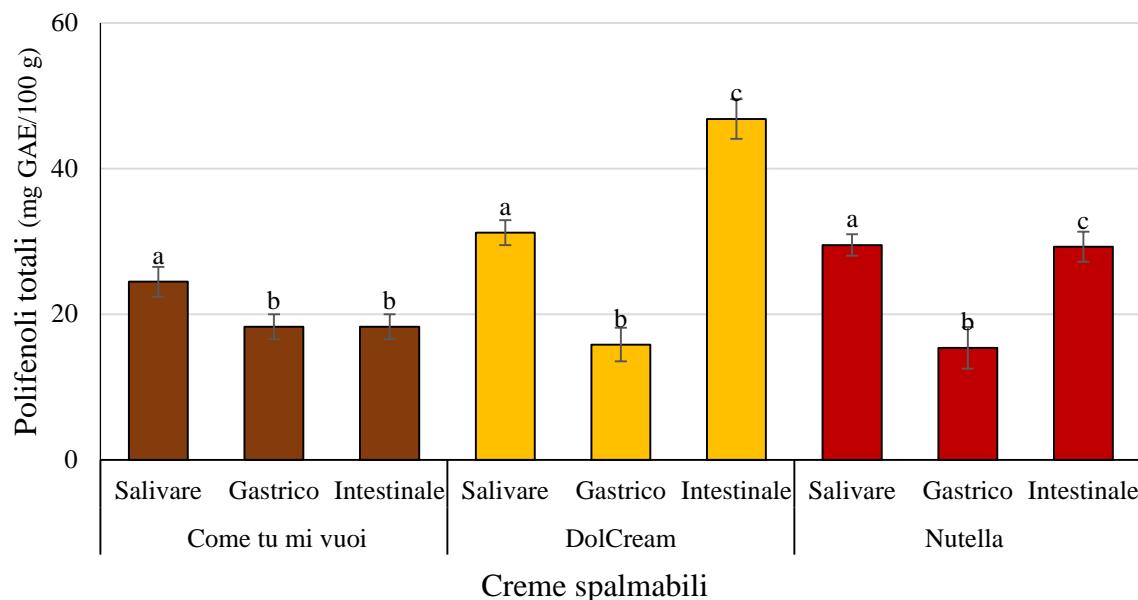


Figura 2. Quantitativo di polifenoli totali rilevato durante le diverse fasi del processo digestivo delle varie creme spalmabili. Apici diversi per ciascuna fase indicano differenze significative per singolo campione ($p<0,05$).

A seguito della digestione *in vitro* dei campioni delle tre creme spalmabili è stata inoltre valutata la degradazione della matrice attraverso l'MDI (%) ovvero il *matrix degradation index*, che valuta la disintegrazione della matrice alimentare durante il processo digestivo. Tale indice viene calcolato in base al quantitativo di particelle solide presenti nei fluidi di digestione (Lamothe et al., 2012). In breve, il fluido ottenuto a seguito di ogni fase digestiva è stato filtrato usando la carta filtro (Whatman n°4) precedentemente essiccata e pesata. Al termine della filtrazione, i solidi residui sul

filtro sono stati essiccati a 105 °C, fino all'ottenimento di un peso costante, e pesati. La massa di solidi è stata utilizzata per ottenere l'MDI, usando l'Eq. (1):

$$MDI (\%) = 100 - \left(\frac{C_i - C_s}{100} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

dove:

C_s = peso iniziale cioccolato da digerire

C_i =peso cioccolato dopo digestione

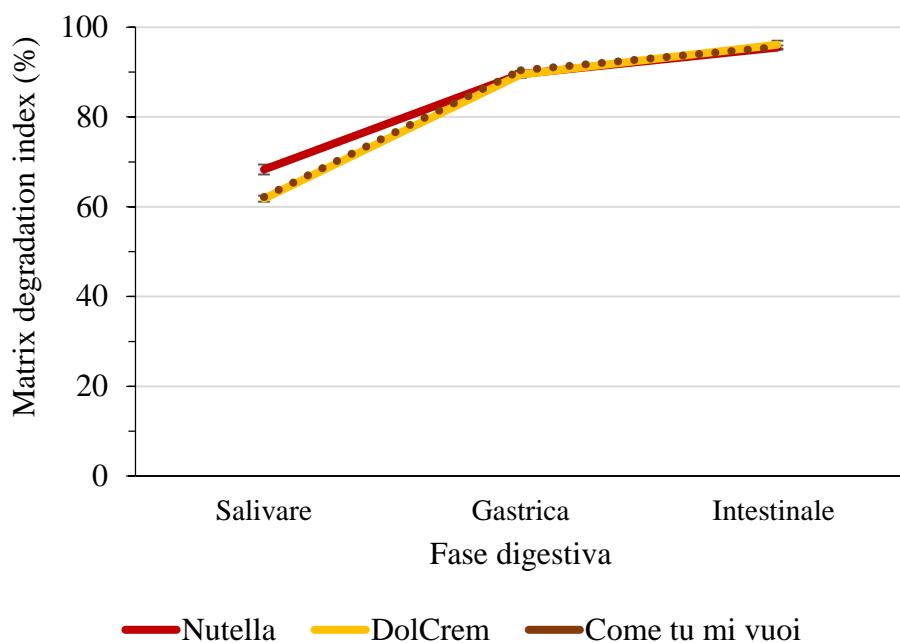


Figura 3. Matrix degradation index (%) delle creme spalmabili alla nocciola rilevato nelle varie fasi di digestione.

Come è possibile evincere dalla Figura 3, l'MDI nella fase salivare è risultato essere più alto nella crema spalmabile Nutella rispetto alla DolCrem ed alla “Come tu mi vuoi”. È importante considerare in che modo i diversi ingredienti presenti nelle creme (grasso, lecitina e lattosio cristallino) possano influire sulla struttura e quindi sulla degradazione della matrice quando sottoposti alla digestione. La microstruttura del cioccolato è il risultato di molti fattori tra cui dimensione delle particelle, quantità e distribuzione di grasso, tipo e quantità di emulsionante e particelle solide (Paz-Yépez et al., 2019). Tra i principali componenti del cioccolato, il più solubile è lo zucchero, il che spiega la più alta degradazione della crema Nutella nella fase salivare. Inoltre, la quantità e la qualità del grasso influenza le interazioni delle particelle, in relazione alle loro

distanze e distribuzione all'interno della matrice alimentare. I valori dell'MDI delle tre creme spalmabili arrivano ad essere, dopo la fase salivare, non statisticamente differenti durante la fase gastrica e la fase intestinale. Dopo 3h di digestione intestinale, tutte e tre le creme spalmabili risultano considerevolmente disintegrate. Questo forte aumento dell'MDI durante la fase intestinale sarebbe imputabile alla lipolisi dovuta alla presenza dell'enzima lipasi, assente durante la fase salivare e quella gastrica.

Valutazione della concentrazione di minerali tramite ICP-MS

Circa 10-20 mg di ogni crema spalmabile sono stati pesati in triplicato e mineralizzati con 350 μ L di HNO_3 68% ultra-puro (Romil LTD) e 1 ml di 30% H_2O_2 a 180 °C per 20 minuti utilizzando un sistema di digestione a microonde StartD® (Milestone Srl). I campioni digeriti sono stati diluiti fino al 2% di HNO_3 con acqua ultrapura (18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ a 25 °C), e quindi analizzati utilizzando un sistema ICP-MS (mod. Agilent 7500ce. Agilent, Milano). Le curve di calibrazione sono state costruite diluendo uno standard multielemento su misura (Romil LTD), con la seguente composizione di soluzione madre: K (20.000 ppm), Ca (10.000 ppm), Mg e P (2.000 ppm), Na (400 ppm), Fe (50 ppm) Mn (40 ppm), B e Zn (20 ppm), Cu (5 ppm), Co, Mo e Se (1 ppm). Sono state così ottenute curve a dodici punti.

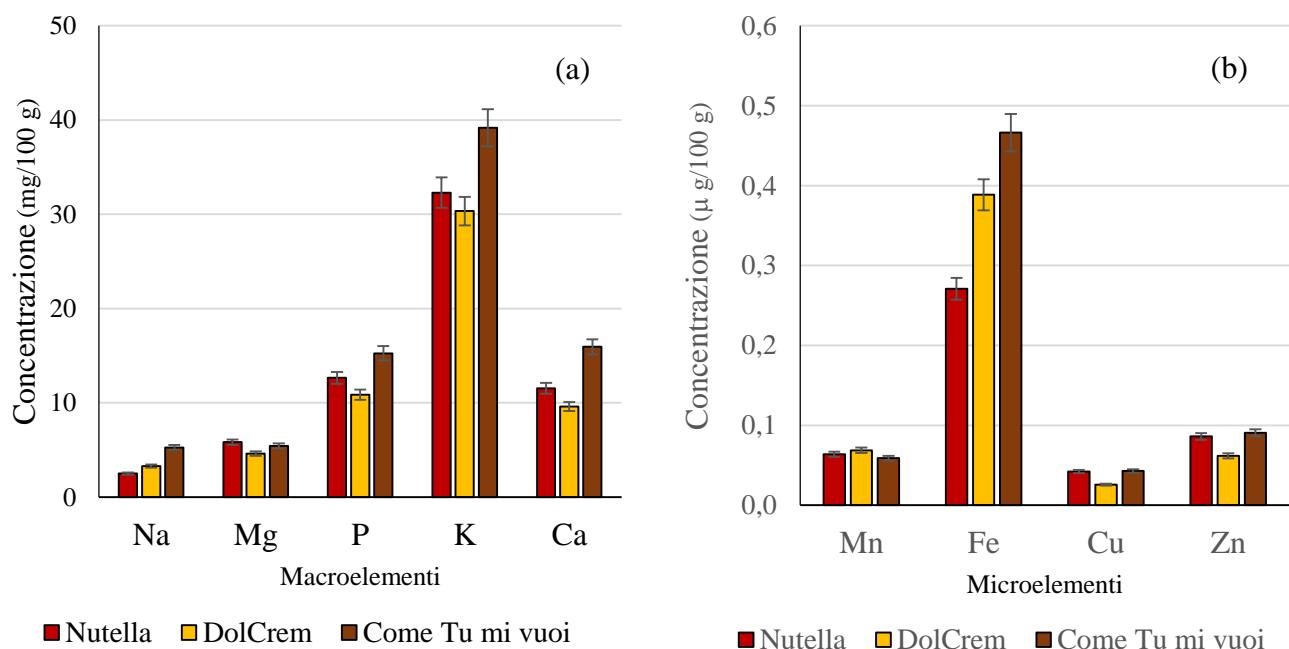


Figura 4. Concentrazione di macro- (a) e micro- (b) elementi nelle varie creme spalmabili.

Dalla Figura 4 si evince come il potassio sia il minerale predominante, seguito da fosforo, calcio e sodio. Le principali funzioni dei minerali essenziali consistono nella formazione ossea, nella trasmissione degli impulsi nervosi, nella modulazione delle reazioni metaboliche, nel mantenimento del sistema colloidale e nella regolazione dell'equilibrio acido-base. I minerali sono anche noti come componenti cruciali di ormoni, enzimi e come attivatore di enzimi (Aydin e Özdemir, 2017). I risultati hanno evidenziato come la crema spalmabile “Come tu mi vuoi” sia risultata più ricca in sodio, fosforo, potassio, calcio ferro, rame e zinco. Le differenze osservate possono essere imputabili a diversi fattori, in primis, ovviamente, i diversi ingredienti e le diverse concentrazioni utilizzate oltre che a specifiche differenze del processo produttivo.

Test di shelf-life accelerata (Accelerated Shelf Life Testing - ASLT)

Lo studio della shelf-life è spesso utilizzato per determinare la durabilità di un alimento, di un farmaco, di un cosmetico o di altri prodotti industriali soggetti ad una variazione nel tempo delle caratteristiche intrinseche. Per quanto riguarda il campo alimentare, uno degli aspetti più importanti riguarda soprattutto la necessità di avere, in tempi rapidi, informazioni attendibili circa la conservabilità di un prodotto. Tale aspetto risulta essenziale sia in termini di sicurezza alimentare, sia per quanto riguarda la qualità chimico-fisica-sensoriale e per il rispetto delle eventuali caratteristiche merceologiche imposte dalla normativa. I modelli di previsione della vita di scaffale di un alimento possono essere basati sulle leggi della cinetica chimica che mettono in relazione la velocità di una determinata reazione con le condizioni di conservazione. È possibile inoltre effettuare prove di conservabilità degli alimenti in condizioni più critiche di quelle reali aumentando, per esempio, la temperatura, l'esposizione alla luce o l'umidità relativa. In tal caso viene favorito un invecchiamento rapido del prodotto e, attraverso l'impiego di modelli matematici, si estrapola la vita di scaffale dell'alimento nelle condizioni di effettiva conservazione (Piergiovanni e Limbo, 2010).

L'approccio per un test di shelf life- accelerata (Accelerated Shelf Life Testing, noto come ASLT) prevede sia la misurazione nel tempo (che risulterà essere breve grazie all'accelerazione introdotta) degli indici di qualità prescelti, sia l'applicazione di un calcolo basato su un modello matematico. Il metodo risulta efficace solo se si conosce esattamente il fattore di accelerazione del decadimento introdotto dalle condizioni di invecchiamento accelerato. Conoscendo tale fattore è possibile risalire alla shelf-life del prodotto. La premessa per la conduzione di un ASLT è che l'effetto ambientale preso come riferimento deve poter essere quantificato come fattore di accelerazione della reazione

degradativa considerata (Robertson, 1993).

Le cause che determinano la degradazione qualitativa di un alimento, associate ad una determinata reazione chimica, sono essenzialmente:

- perdita del valore nutritivo;
- perdita di colore;
- imbrunimento non enzimatico;
- ossidazione/irrancidimento dei lipidi;
- variazione della texture;
- riduzione o variazione dell'aroma/sapore.

Nell'ambito di questi, l'indice di qualità che prima di altri raggiunge il livello critico è quello che rappresenta il fattore limitante per la shelf-life dell'alimento. Considerando la tipologia di prodotto e la composizione, per le creme spalmabili, che risultano essere formulate con un elevato contenuto in grassi e/o oli, è stato scelto come elemento critico il livello di ossidazione della frazione lipidica. Per un gran numero di alimenti confezionati la perdita di qualità nel tempo, ovverosia la velocità di variazione di uno specifico indice di qualità, può essere modellata, a temperatura costante, utilizzando l' Eq. (2)

$$dA/dt = kA^n \quad (\text{Eq. 2})$$

dove:

k = costante di velocità specifica

t = tempo

A = grandezza misurabile che esprime l'indice di qualità

n = fattore di potenza chiamato ordine di reazione.

L'espressione ha segno negativo se la grandezza A diminuisce al diminuire della qualità, positivo se aumenta. La relazione tra l'indice di qualità ed il tempo assume una forma diversa in funzione del valore dell'esponente n , passando da una relazione lineare a curve sempre più accentuate. Nella maggior parte dei casi l'esponente ha valore 0, 1 o 2 e la cinetica si definisce, rispettivamente, di ordine zero, primo e secondo. Sono molto numerose le reazioni chimiche e i fenomeni anche più complessi la cui cinetica può essere descritta efficacemente con un modello di cinetica di primo



ordine. Esempi di rilievo sono le reazioni di distruzione di molti nutrienti, di alcuni pigmenti, l'accumulo di prodotti dell'imbrunimento non enzimatico e proliferazione microbica. Meno comuni, ma comunque numerose, sono le reazioni che seguono cinetiche di ordine zero, indipendenti dalla concentrazione dei reagenti; più rare quelle di secondo ordine, come la distruzione della vitamina C. Ad ogni modo, le cinetiche di ordine zero di primo e secondo ordine possono essere rappresentate da equazioni di primo grado che descrivono una retta. Ne deriva che l'ordine di reazione di un fenomeno sconosciuto (se di ordine zero, primo o secondo) può essere sempre individuato verificando la linearità delle interpolazioni dei punti sperimentali, negli spazi A vs t , $\ln(A)$ vs t e $1/A$ vs t , rispettivamente (A = indice di qualità, t = tempo).

Quanto meglio le equazioni interpolano i punti sperimentali raccolti – in pratica quanto più vicino all'unità è il coefficiente di determinazione (R^2) calcolato – tanto più elevata è la probabilità di stimare con precisione l'ordine di reazione. Dall'Eq. (2) si evince che la shelf-life (t) degli alimenti è inversamente proporzionale alla costante di velocità e dalla sua integrazione, per una reazione di ordine zero in cui la velocità con cui varia l'indice di qualità è costante e non dipende dal valore di A , si ottiene l'equazione (Eq. 3):

$$t = (A_0 - A_e)/k \quad (\text{Eq. 3})$$

dove:

A_0 = valore di qualità iniziale;

A_e = valore di qualità alla fine della shelf-life;

t = shelf-life in giorni, mesi, anni, ecc.

k = costante di velocità specifica

Quasi tutte le reazioni di decadimento della qualità alimentare sono fortemente influenzate dalla temperatura e la dipendenza della loro velocità dalla temperatura del sistema può essere efficacemente descritta dalla legge di Arrhenius (Eq. 4):

$$k = k_0 \times e^{-E_a/RT} \quad (\text{Eq. 4})$$

dove:

k = costante di velocità specifica

k_0 = fattore pre-esponenziale

E_a = energia di attivazione ($\text{kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

R = costante universale del gas ($8,318 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatura assoluta (K)

Secondo questa legge la costante di velocità aumenta in modo esponenziale al crescere della temperatura, in base all'energia di attivazione della reazione. In forma logaritmica la legge di Arrhenius assume la forma dell'equazione di una retta (Eq. 5) nello spazio $\ln k$ vs $1/T$ (Fig. 5):

$$\ln k = \ln k_0 - \left(\frac{E_a}{R} \right) \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 5})$$

Dal valore del coefficiente angolare della retta (E_a/R), conoscendo il valore della costante R , è possibile determinare il valore di E_a conoscendo alcuni valori delle costanti di velocità (k) a diverse temperature. Ciò permette quindi di calcolare un parametro di fondamentale importanza che spiega la sensibilità termica della reazione. Quanto più alta è l'energia di attivazione, tanto più alta diventerà la velocità di reazione per un incremento di temperatura e, per lo stesso motivo, tanto più si abbasserà la sua velocità per un decremento di temperatura.

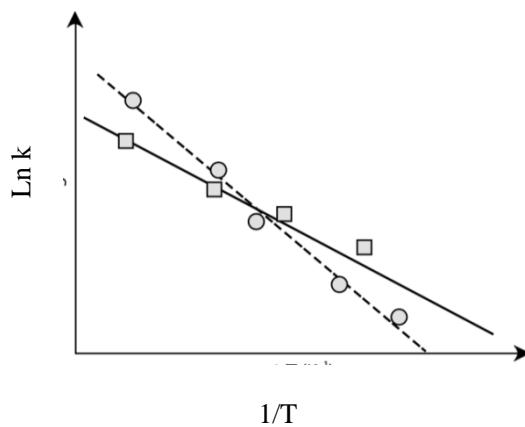


Figura 5. Relazione tra velocità di reazione e reciproco della temperatura, secondo la legge di Arrhenius, per due fenomeni con diversa E_a .

Raccogliendo dati sperimentali relativi alle velocità di reazione o ai tempi di conservazione di un prodotto e grazie alla conoscenza di una relazione che li lega al fattore di accelerazione prescelto, è possibile stimare la velocità del decadimento o la shelf life nelle condizioni di reale interesse. Poiché, come detto, nella maggior parte dei casi il fattore impiegato è la temperatura, è la legge di

Arrhenius che fornisce la base teorica per risalire al vero tempo di shelf life, dopo aver determinato quello in condizioni accelerate. Conoscendo tutti gli elementi dell'equazione di Arrhenius (K_0 , E_a , R e T) si dispone dei dati necessari per applicare correttamente un test di shelf life accelerata per un aumento di temperatura. Considerando una cinetica di ordine zero e un indice di qualità che aumenta nel tempo, come nel caso dell'ossidazione lipidica, l' Eq. (3):

$$t = (Ae - A_0) / k$$

può essere riscritta considerando l'equazione di Arrhenius

$$k = k_0 \times e^{-E_a/RT}$$

ottenendo l'equazione

$$t = (Ae - A_0) / k_0 \times e^{-E_a/RT}$$

che rappresenta la relazione che lega la shelf life e la temperatura e consente, conoscendo l'energia di attivazione del fenomeno e il valore della costante di velocità a una data temperatura (o quello di shelf life), di stimare quello alla temperatura di interesse.

Impostazione dell'ASLT per le creme spalmabili alla nocciola

Considerando che le creme spalmabili alla nocciola sono costituite da oltre il 30% di grassi, l'ossidazione dei lipidi è stato selezionata come il fenomeno degradativo principale, fortemente accelerato da un incremento di temperatura e che prima di altri raggiunge il livello critico. Le creme spalmabili alla nocciola sono state stoccate a 4 diverse temperature: 15, 30, 40 e 50 °C e la valutazione dell'ossidazione dei campioni è stata effettuata valutando la concentrazione dei prodotti primari (idroperossidi) e secondari (carbonili) derivanti dal processo alterativo. In base ai risultati ottenuti per la stima della shelf life si è scelto di utilizzare i dati relativi alla formazione dei prodotti primari dell'ossidazione.

Misura dell'ossidazione primaria delle creme spalmabili e stima della shelf-life

La misurazione dell'ossidazione lipidica è stata effettuata seguendo il metodo proposto da Katsuda et al. (2008). In breve 0,3 g di cioccolata spalmabile sono stati mixati con 1,5 ml di una soluzione di isottano/ 2-propanol (3:1 v/v) and agitati 5 volte per 10 s, attendendo 6 minuti tra una agitazione e

l'altra. Dopo la aver centrifugato per 5 min a 4480 g (Microfuge 18, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), 0,20 ml del surnatante sono stati prelevati e quantificati applicando il metodo riportato da Shanta e Decker (1994). In breve, 0,2 ml del campione estratto sono stati miscelati a 2,8 ml di una soluzione di metanolo /butanolo (2:1 v/v), 30 μ L di una soluzione tiocianato/Fe²⁺. Dopo aver incubato i campioni per 20 min al buio, è stata letta l'assorbanza a 510 nm.

La concentrazione di idroperossidi è stata determinata usando una retta di calibrazione dell'idrossido di cumene (0-0,4 mM). La soluzione di tiocianato/Fe²⁺ è stata preparata in due fasi: inizialmente è stata preparata una soluzione di ammonio tiocianato in acqua (soluzione 1); successivamente il BaCl₂ è stato sciolto in 0,4M di HCl, ottenendo una soluzione allo 0,8% wt/v. In seguito un dato volume di questa soluzione è stato miscelato ad un uguale volume di una soluzione all'1% di FeSO₄ in acqua. La soluzione ottenuta è stata quindi centrifugata per 10 min a 4480 g, e un volume noto del surnatante è stato addizionato con un uguale volume della soluzione di FeCl₂ (soluzione 2). La risultante soluzione è stata quindi addizionato con un uguale volume della soluzione 1.

In Figura 6 sono riportati i dati relativi all'ossidazione primaria delle tre creme spalmabili alla temperatura di stoccaggio di 15, 30, 40 e 50 °C. Come si evince dai grafici, per tutte le formulazioni considerate la produzione di perossidi segue una cinetica di primo ordine. Il valore dei perossidi, espresso in mEq O₂/kg di grasso, aumenta più velocemente man mano che aumenta la temperatura di stoccaggio. Andando a plottare il ln del valore del coefficiente angolare di ciascuna curva riportata in Figura 6 in funzione di 1/T, ovvero del reciproco della temperatura di stoccaggio espressa in K, si ottiene il valore dell'energia di attivazione (Ea) di ogni singola reazione. L'Ea, ovvero il quantitativo di energia necessario per produrre idroperossidi è risultata essere 11,55 KJ/mol K per la crema "Come tu mi vuoi", 11,80 KJ/mol K per la Dolcrem 11,88 KJ/mol K per la Nutella.

Applicando quindi l'equazione di Arrhenius (Eq. 4) è stato possibile ottenere il valore k che, sostituito all'Eq. (2) permette di ottenere la predizione della shelf-life residua delle creme spalmabili (Tab. 5). La shelf-life per tutte le creme spalmabili diminuisce, ovviamente, all'aumentare della temperatura di stoccaggio con valori significativamente più bassi per la crema "Come tu mi vuoi".

Tali risultati erano attesi data la diversa percentuale in acidi grassi insaturi presenti nella crema "Come tu mi vuoi". Ciononostante la crema in questione impiegherebbe, alla temperatura di stoccaggio di 20°C, altri due mesi per raggiungere il limite di perossidi stabilito per le creme

spalmabili di 10 mEq di O₂/kg di (Rossini et al., 2011). Sommando alla shelf life residua calcolata in questo studio i 5 mesi trascorsi dalla produzione delle creme spalmabili si otterrebbe una predizione di shelf life a 20°C di circa 7 mesi per le creme “Come tu mi vuoi” e DolCrem e di circa 8 mesi per la Nutella. Oltre che per la diversa presenza dell’olio di palma, la Nutella differisce dalla “Come tu mi vuoi” e dalla DolCrem per la presenza di zuccheri.

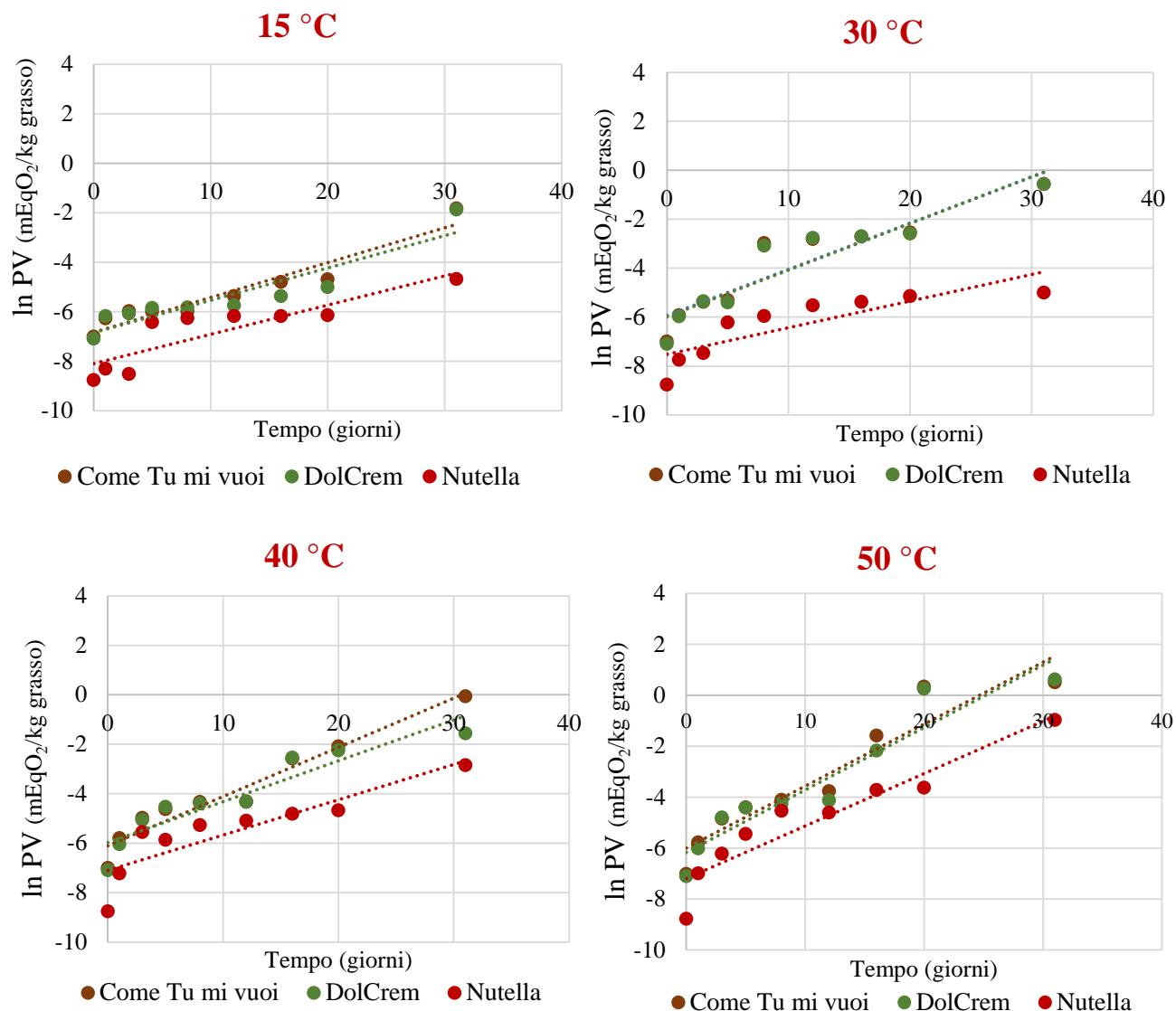


Figura 6. Andamento dell’ossidazione primaria delle creme spalmabili alla nocciola a 15, 30, 40 e 50°C.

Diversi ricercatori (Sims et al., 1979; Ponginebbi et al., 1999) hanno ipotizzato che anche la presenza dello zucchero sia in grado di ritardare l’ossidazione degli acidi grassi aumentando la viscosità della matrice alimentare. Tale aumento comporterebbe una riduzione della diffusione dell’ossigeno all’interno del prodotto e ridurrebbe la mobilità dei reagenti e dei prodotti di reazione,

prevenendo così l'ossidazione degli acidi grassi. Questo verrebbe confermato dai valori della viscosità riportati in Tabella 3. Una seconda ipotesi è che, come riportato da Yamauchi et al. (1982), l'utilizzo di zuccheri riducenti (xilosio, arabinosio, fruttosio, glucosio, galattosio e maltosio) possa accelerare l'ossidazione mentre la presenza di zuccheri non riducenti, come il saccarosio, il sorbitolo, l'inositolo e il metil-a-D-glucoside possa inibirla.

Tabella 5. Predizione della shelf-life alle temperature utilizzate per la valutazione dell'ossidazione (15, 30, 40 e 50°C) ed alle normali temperature di stoccaggio (20-25°C)

Crema	K ₀	T (°C)	Shelf-life (giorni)
Come Tu mi vuoi	17,68	15	65,52
		30	51,60
		40	44,57
		50	38,85
		20	60,34
		25	55,73
DolCrem	18,40	15	70,67
		30	55,37
		40	47,67
		50	41,43
		20	64,97
		25	59,90
Nutella	14,83	15	106,77
		30	83,51
		40	71,83
		50	62,36
		20	98,10
		25	90,36

Misurazione dell'ossidazione secondaria delle creme spalmabili

La valutazione dell'ossidazione secondaria delle creme spalmabili è stata misurata seguendo il metodo AOCS (1997). Questo metodo si basa sulla reattività delle aldeidi con la p-anisidina in acido acetico, con la formazione di una base di Schiff che assorbe a 350 nm. Nel dettaglio 0,2 g di cioccolata sono stati miscelati con 4,8 ml di isottano, agitati e centrifugati per 20 min a 3900 g.

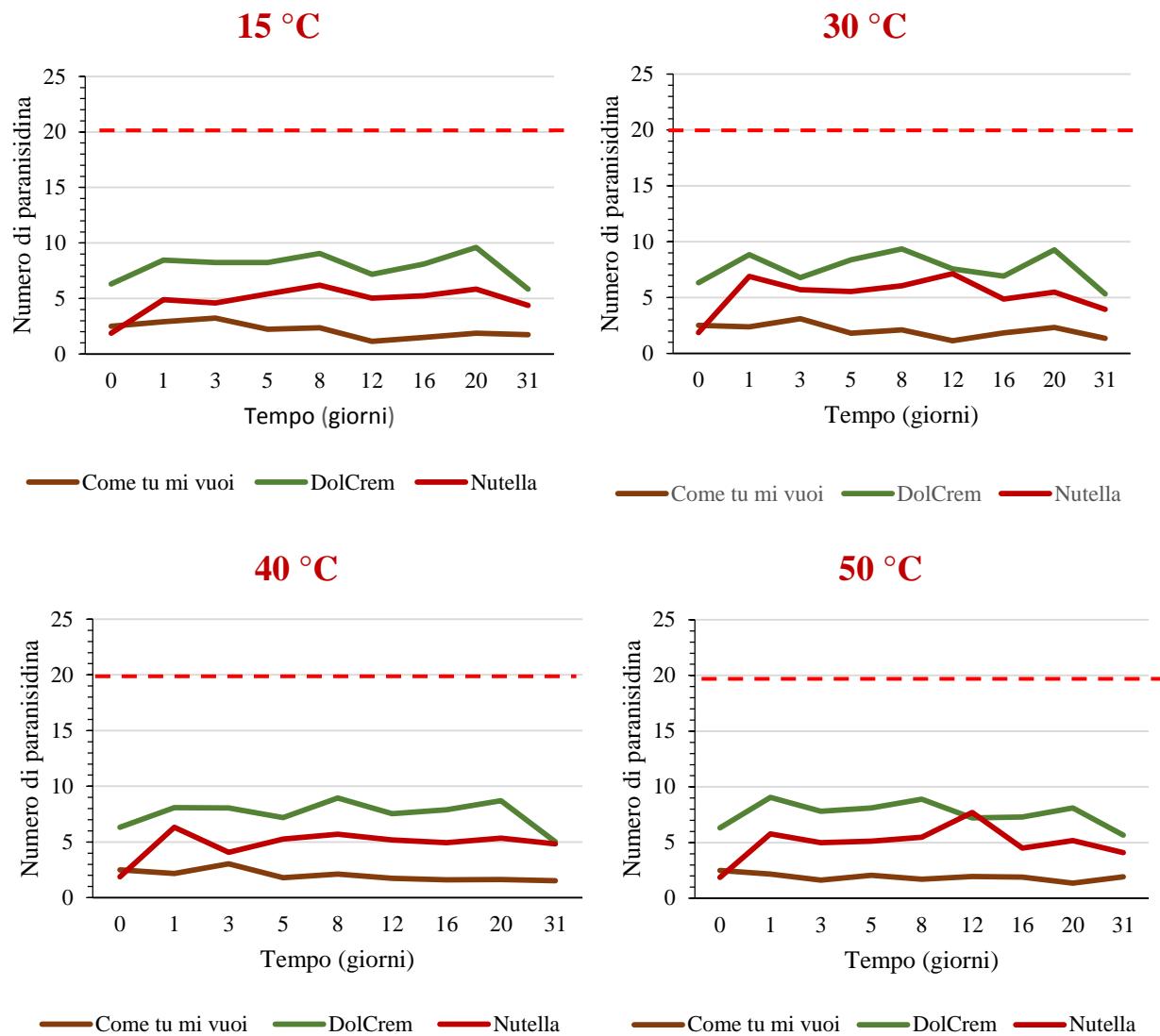


Figura 7. Valore di p-anisidina misurato nelle creme spalmabili sottoposte a test di shelf-life accelerata.

L'assorbanza di 1,5 ml del surnatante è stata misurata e successivamente 0,2 ml del reagente paranisidina (0,25 g discioli in 100 ml di acido acetico) sono stati aggiunti ad ogni cuvetta e agitati dolcemente. Dopo 10 min di incubazione al buio, l'assorbanza è stata letta a 350 nm. I risultati sono stati espressi in termini di valore di p-anisidina (P-AnV) e sono stati calcolati usando la seguente

formula:

$$P-AnV = 5 \times (1,2x \text{ As} - \text{Ab})/\text{m}$$

Dove

As = assorbanza dopo la reazione con il reagente

Ab = assorbanza prima dell'aggiunta del reagente

M = massa del cioccolato usata per l'estrazione

All'analisi i vari tipi di creme non hanno mostrato significative variazioni del valore di p-anisidina sia in funzione del tempo che della temperatura. Tutte le creme non hanno mai superato il valore di 10 e tenendo presente che in letteratura si considera accettabile un prodotto quando il valore di p-anisidina è inferiore a 20 (limite riportato in rosso nella Figura 7) tutte le creme hanno dato risultati più che soddisfacenti.

Analisi sensoriale e accettabilità del prodotto

Al fine di valutare l'accettabilità delle tre tipologie di creme spalmabili, i campioni sono stati analizzati dal punto di vista sensoriale. A tale scopo a 70 giudici non addestrati (39 donne e 31 uomini di età compresa tra i 21 e i 62 anni) è stato chiesto di esprimere il gradimento riguardo l'aspetto, l'aroma, il sapore e la consistenza oltre ad esprimere un giudizio sul gradimento generale usando una scala edonica a 11 punti che va da 1, "il più sgradevole immaginabile", a 11 "il più gradevole immaginabile. In dettaglio, ogni giudice ha ricevuto 15 g di campione e l'ordine di presentazione degli stessi è stato randomizzato e bilanciato (Fig. 8).



Figura 8. Esempio di vassoio presentato ai giudici per l'analisi sensoriale delle creme spalmabili.

DGR 11/2019 "La ricerca a sostegno della trasformazione aziendale - Innovatori in azienda - "Titolo progetto: "Sviluppo di prodotti a base cioccolato fortificati con composti bioattivi" CUP B34J18000130002 Cod progetto: 1695-16-11-2018.

Dai dati relativi all’analisi sensoriale effettuata sulle tre creme spalmabili riportati in Figura 9, si evince come la crema “Come tu mi vuoi” non sia valutata significativamente differente per gli attributi sensoriali selezionati dalla crema Dolcream. Relativamente alla comparazione con la crema spalmabile Nutella, la “Come tu mi vuoi” si differenzia leggermente, ma in maniera statisticamente significativa, solo per l’attributo *aspetto*. Ciò evidenzia come il prodotto scelto per la fortificazione sia risultato essere ottimale anche da un punto di vista di percezione da parte del consumatore. Va inoltre evidenziato come, sebbene da un punto di vista statistico non esistano differenze significative, le 3 creme hanno mostrato tendenzialmente un gradimento generale diverso che ha visto prevalere le creme Dolcrem e “Come tu mi vuoi”, con un punteggio medio di 8,25 e 8,24 rispettivamente. La crema Nutella è risultata essere quella meno gradita con un punteggio medio di 7,87.

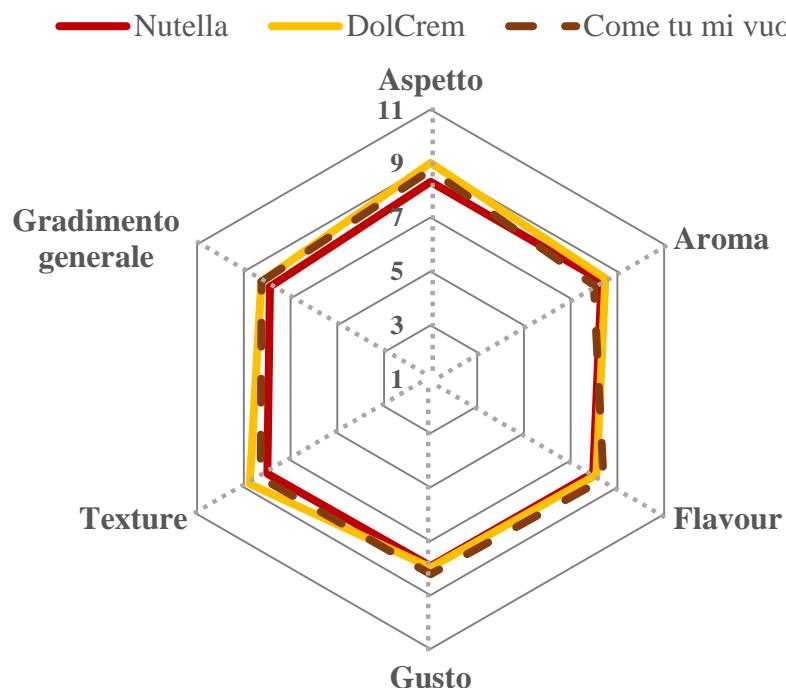


Figura 9. Valutazione sensoriale delle tre creme spalmabili.

Ricerca bibliografica e di mercato finalizzata alla scelta dei composti bioattivi da poter utilizzare per la formulazione di alimenti funzionali

Dopo aver caratterizzato la crema spalmabile su cui lavorare ed averla caratterizzata e confrontata con due referenze analoghe presenti sul mercato, si è proceduto ad effettuare una ricerca bibliografica allo scopo di identificare i composti bioattivi più idonei per realizzare il prodotto fortificato. Particolare attenzione è stata data anche alla possibilità di identificare, per uno stesso

composto, la formulazione più adatta per l'incorporazione nel substrato scelto. Inoltre è stato preso come parametro di riferimento anche la potenziale concentrazione da ottenere nella crema finale, tenendo presente l'eventuale dose di assunzione giornaliera raccomandata dagli enti preposti. In base alla normativa di riferimento (Reg. CE 1925/2006- Allegato I) relativa all'aggiunta di vitamine, sali minerali e altre sostanze agli alimenti, tenuto conto dell'offerta proposta dai *competitors* e considerando le deficienze di micronutrienti della fascia di consumatori cui è rivolta la crema spalmabile, i bambini, si è scelto di fortificare la cioccolata spalmabile con la vitamina D. Le vitamine sono sostanze di cui l'organismo necessita per l'accrescimento, lo sviluppo ed il compimento di migliaia di reazioni metaboliche. La vitamina D, in particolare, aiuta l'organismo ad assorbire il calcio, che è uno dei principali costituenti delle ossa. Una carenza di vitamina D può causare quindi malattie ossee, come l'osteoporosi o rachitismo. Rispetto alle altre vitamine, la vitamina D si caratterizza per un'azione più simile a quella degli ormoni e per la capacità di modulare l'espressione genica, oltre che per il coinvolgimento diretto o indiretto in una molteplicità di processi di regolazione metabolica e funzionale, estremamente diversificati, a livello di innumerevoli organi e apparati. Le azioni della vitamina D nel corpo umano sono mediate dal legame al suo recettore specifico (*vitamin D receptor*, VDR), presente sulle membrane delle cellule dei tessuti e degli organi bersaglio (ossa, denti, apparato cardiovascolare, cellule del sistema immunitario ecc.), e dalla successiva internalizzazione e trasferimento nel nucleo cellulare del complesso formato, che va a interagire con specifiche sequenze del DNA, innescando la sintesi di proteine caratterizzate da attività ben definite. Le attività e funzioni della vitamina D sono talmente numerose e complesse che a oggi, nonostante intense ricerche, sono ancora note soltanto in parte. Basti pensare che la carenza di vitamina D, riscontrata in circa l'80% della popolazione (Adami et al., 2011) è correlata a malattie cardiovascolari, ipertensione, diabete, dislipidemie, sindrome metabolica, malattie autoimmuni, malattie infettive ed obesità. Essendo la Vitamina D3 (colecalciferolo) la forma più attiva (Armas et al., 2004) ed essendo la sua attività fortemente collegata al metabolismo del calcio (Jackson et al., 2006, Wang et al., 2006) questi due microelementi sono stati utilizzati congiuntamente nella fortificazione della crema al cioccolato. Per quanto concerne le concentrazioni di riferimento dei micronutrienti (Ca e vit. D), data la non omogeneità dei valori presenti in letteratura, si è deciso di far riferimento a quanto riportato nel Federal Register dell'US Government (2016) (Allegato II), in cui la dose giornaliera raccomandata di vit. D è pari a circa 15 µg. Tale scelta è stata dettata dalla possibile collocazione sul mercato estero della crema alla nocciola fortificata con vitamina D e calcio. Partendo da questo presupposto

è stato stabilito di fortificare la cioccolata spalmabile con 166 µg/kg di Vitamina D e con 11,6 g/kg di calcio, corrispondenti al 30% dell' RDA (*Recommended Daily Allowance*) al fine di evitare possibili fenomeni di ipervitaminosi. Inoltre, poiché la vitamina D risulta essere estremamente sensibile alla luce, al calore ed all'ossigeno è stata valutata la possibilità di produrre microcapsule da utilizzare in fase di fortificazione delle creme spalmabili.

Reperimento dei possibili fornitori commerciali dei composti bioattivi

Considerato quanto sopra esposto, è stata fatta un'indagine commerciale per identificare potenziali fornitori di vitamina D e di calcio con requisiti di idoneità per la fortificazione di prodotti alimentari. I potenziali fornitori identificati sono stati

- Vitamina D in polvere: Colecalciferolo (Sigma Aldrich – Milano Italy; DSM Human Nutrition & Health Holding AG, Kaiseraugst, Svizzera)
- Calcio: Carbonato di calcio e calcio citrato tetraidrato (Sigma Aldrich – Milano Italy)
- Vitamina D microincapsulata: CapsuleDar ® D3 100 E (Lycored Co. Orange, NJ, USA)
- Vitamina D microincapsulata: CapsuleDar ® D3 CSW (Lycored Co. Orange, NJ, USA)

Poiché la dimensione media degli ingredienti presenti nelle creme spalmabili non deve superare i 30 micron, pena la comparsa della sensazione di granulosità nel prodotto, è stato necessario, al momento della scelta dei possibili fornitori, valutare la granulometria degli ingredienti da dover aggiungere. In base a tale necessità, è risultato che le dimensioni del carbonato di calcio e del calcio citrato tetraidrato non fossero idonee alla fortificazione della crema spalmabile alla nocciola. Anche riguardo le microcapsule, le dimensioni riportate dal fornitore di 10-350 µm (Allegato III) non hanno reso possibile il loro utilizzo per la formulazione di creme spalmabili. Per tale motivo, è stato necessario produrre presso il laboratorio di tecnologie alimentari dell'Università di Verona sia il calcio, sotto forma di nanoparticelle, sia la vitamina D microincapsulata

Produzione di nanoparticelle di Mg-CaCO₃

Per poter aggiungere il calcio alla cioccolata spalmabile si è resa necessaria la produzione di nanoparticelle di magnesio calcio carbonato (Mg-CaCO₃) ottenute miscelando per 10 secondi una soluzione 0,1 M di carbonato di sodio con una soluzione 0,1 M di cloruro di calcio e 0,1 M di cloruro di magnesio. La miscela così ottenuta è stata centrifugate e lavata 4 volte con l'etanolo

prima dell'essiccazione. La granulometria del Mg-CaCO₃ così ottenuto è stata stimata valutando la DLS (Dynamic Light Scattering), utilizzando lo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, United Kingdom). Come riportato in Figura 10 la dimensione media delle particelle (300 nanometri) è risultata essere inferiore di due ordini di grandezza rispetto al limite di rilevabilità sensoriale pari a 30 micron.

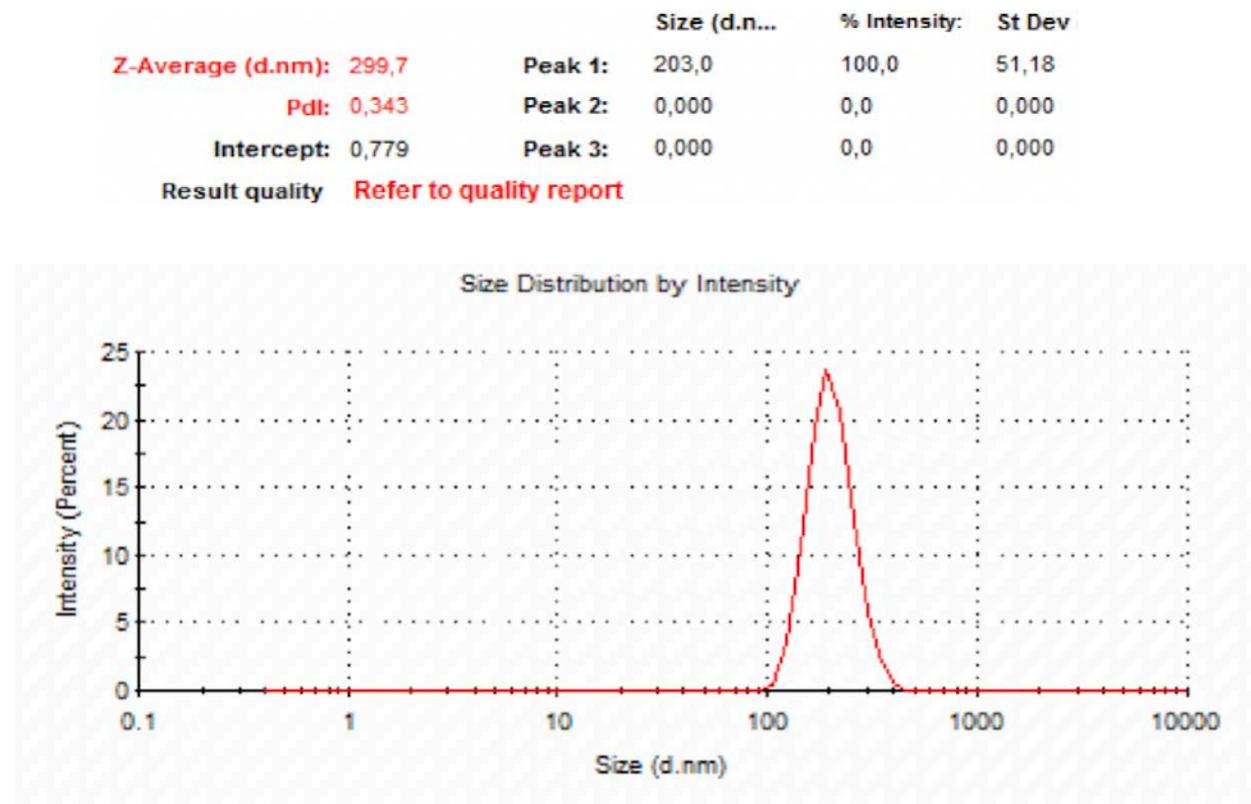


Figura 10. Dimensione e Particle size distribution del Mg-CaCO₃

Messa a punto del processo di microincapsulazione di composti bioattivi di interesse.

La vitamina D è una vitamina liposolubile estremamente sensibile alle condizioni ambientali. Ad esempio la luce, il calore, e l'ossigeno possono rapidamente indurre l'isomerizzazione o l'ossidazione della vitamina avendo effetti avversi sulla struttura e sugli effetti fisiologici (Ballard et al., 2007). Recentemente, nel settore alimentare e nutraceutico ha suscitato enorme interesse la microincapsulazione di composti bioattivi lipidici poiché, mediante questa tecnica, è possibile attraverso il rivestimento con uno polimero protettivo, aumentare la stabilità e preservare le proprietà durante la lavorazione e lo stoccaggio del nutraceutico (Huang et al., 2010). Un altro vantaggio legato alla microincapsulazione è la possibilità di ottenere un rilascio controllato del composto bioattivo nel sito di utilizzo migliorando così la bioattività e diminuendo i potenziali

effetti collaterali dell' iper-vitaminosi a causa di alte dosi di somministrazione (Gonnet et al., 2010). Tra i diversi polimeri di rivestimento utilizzabili per la microincapsulazione di composti lipofilici, il presente progetto ha esplorato il possibile utilizzo della zeina in combinazione con il chitosano. La zeina proteina appartenente al gruppo delle prolammine presente nei semi del mais, è caratterizzata dalla presenza di residui amminoacidici sia lipofilici (3/4) che idrofilici (1/4). Questa particolare caratteristica, che rende la zeina solubile in miscele costituite da acqua ed alcol, è alla base della capacità della proteina di generare film e di formare nanocapsule mediante autoassemblaggio. Il chitosano è invece un polimero naturale ampiamente utilizzato nella microincapsulazione grazie alla sua versatilità.

Durante la formulazione delle microcapsule è stata anche considerata la possibilità di microincapsulare la vitamina D con la rutina, un glicoside flavonoico con spiccata attività antiossidante.

Produzione delle microcapsule contenenti vitamina D e rutina

Le microcapsule contenenti vitamina D, rutina o vitamina D e rutina sono state prodotte usando la combinazione di due tecniche: precipitazione indotta dall'anti-solvente ed eliminazione dell'acqua. Nel dettaglio, 45 mg di vitamina D e 30 mg di rutina sono stati disciolti in 15 ml di etanolo assoluto. Questa soluzione è stata poi pompata, ad una velocità di 2 ml/min, in 40 ml di una soluzione di zeina. La soluzione di zeina è stata preparata sciogliendo 0,5 g di polvere in 40 ml di etanolo al 70% e lasciando in agitazione per 1 h. La miscela è stata quindi pompata ad una velocità di 1,7 ml/min in 150 ml di chitosano preparato sciogliendo 0,5 g di polvere in acqua deionizzata all'1% di ac. acetico (v/v). La miscela è stata mantenuta sotto agitazione per 1 ora a 200 rpm. Sono inoltre stati prodotti campioni senza vit- D e senza vit. D + rutina come controllo (Tab. 8).

Tabella 8. Formulazioni prodotte per l'ottenimento di microcapsule.

	Zeina (g/ 100 ml)	Chitosano (g/ 100 ml)	Vitamina D (g/ 100 ml)	Rutina (g/ 100 ml)
ZC-VDR	0,240	0,550	0,022	0,015
ZC-R	0,240	0,550	--	0,015
ZC	0,240	0,550	--	--

ZC= zeina + chitosano; ZC-VDR= zeina + chitosano – vit. D e rutina; ZC-R = zeina + chitosano – rutina

Successivamente si è proceduto alla rimozione dell’acqua testando tre diverse tecniche: la liofilizzazione, l’essiccazione in stufa e lo spray-drying (Fig 19).

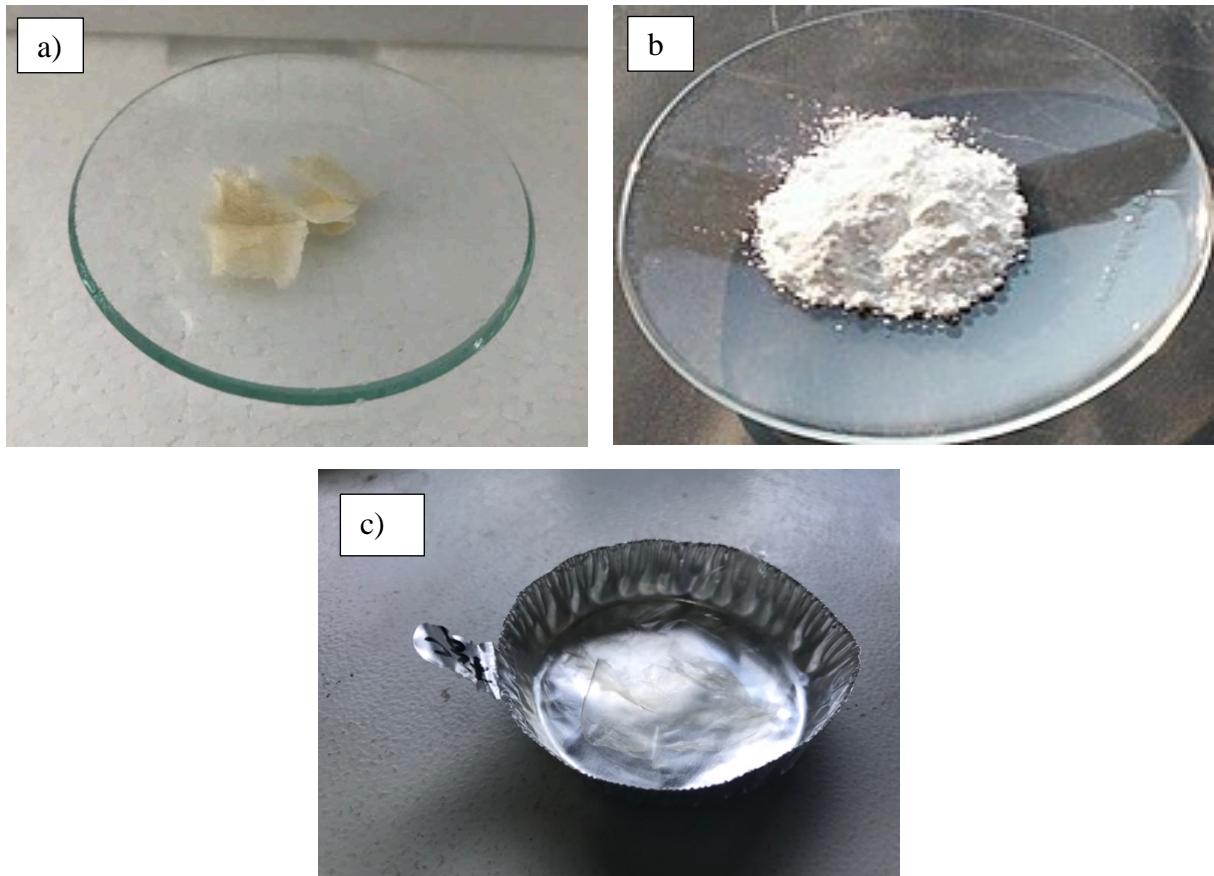


Figura 19. Rimozione dell’acqua della formulazione controllo (ZC) tramite liofilizzazione (a), spray dryer (b) e stufa (c).

La liofilizzazione è avvenuta utilizzando un liofilizzatore CoolSafe 90-80 (Scavac, Lynge, Denmark), l’essiccazione in stufa ponendo il campione overnight in stufa (M60-VN, MPM Instruments srl, Bernareggio, Italia) a 50 °C mentre per lo spray-drying è stato utilizzato un Mini Spray Dryer B-290 Advanced (Buchi, Svizzera) alle seguenti condizioni di esercizio: temperatura d’ingresso 180 °C, temperatura d’uscita 85-90 °C; pump ratio al 15% e aspirator ratio al 95%. Sono state condotte varie prove con i tre diversi sistemi di rimozione dell’acqua per cercare di ottimizzare i parametri di processo ed ottenere i migliori risultati, tenendo conto anche del tempo necessario per l’ottenimento di un prodotto disidratato. Malgrado i tentativi di ottimizzazione tra i metodi usati per la rimozione dell’acqua, solo la tecnica di spray-drying ha permesso di ottenere una polvere con caratteristiche soddisfacenti. Infatti, essiccando in stufa la presenza nelle formulazioni di chitosano

determinava la formazione di una pellicola liscia e traslucida ma non riducibile a una polvere, mentre utilizzando la liofilizzazione le proteine presenti nelle soluzioni hanno portato alla formazione di un'unica massa dalla consistenza simile a quella dell'ovatta, a causa della reticolazione delle proteine.

Conseguentemente per il prosieguo dell'indagine ci si è orientati verso l'utilizzo della tecnica di spray-drying per una adeguata produzione di particelle di piccole dimensioni che sono state sottoposte ad adeguata caratterizzazione per definirne un potenziale impiego per la fortificazione delle creme spalmabili.

Estrazione e quantificazione della vitamina D e della rutina

Il quantitativo di vitamina D e di rutina presente nelle polveri ottenute tramite spray-drying è stato valutato previa estrazione a freddo delle microcapsule. Nello specifico, 10 mg di capsule sono state poste all'interno di un mortaio, collocato in un box contenente del ghiaccio, ed i composti bioattivi sono stati estratti aggiungendo goccia a goccia 10 ml di una soluzione di etanolo/ac, acetico 99:1 (vol/vol) . Durante i 60 min di incubazione, il mortaio è stato accuratamente coperto con un foglio di alluminio e la miscela è stata mescolata per 30s ogni 5 minuti. La miscela così ottenuta è stata quindi filtrata, allontanando i primi 3 ml di filtrato, ed analizzata tramite HPLC.

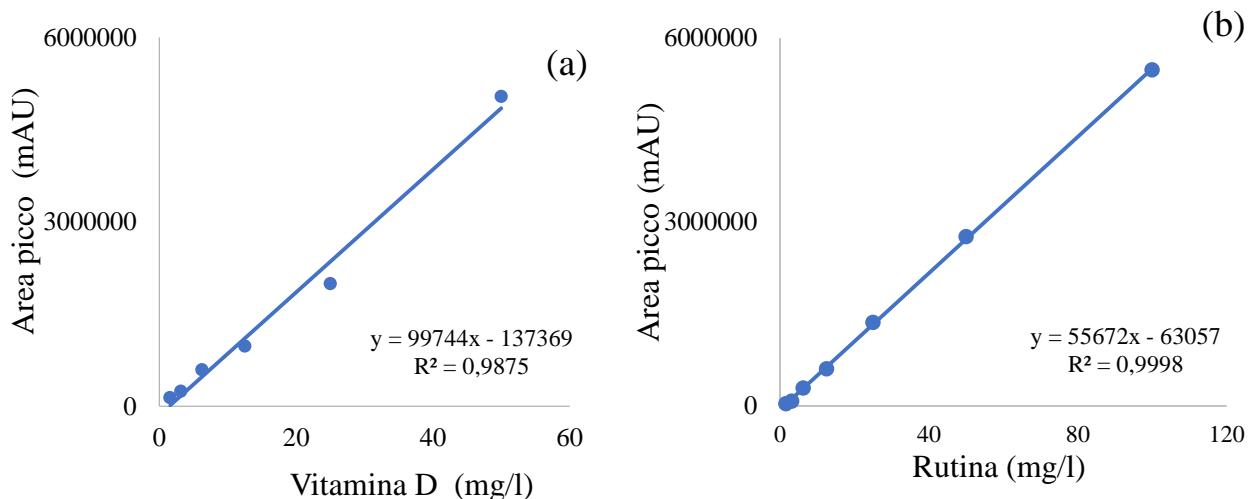


Figura 20. Rette di taratura per la vitamina D (a) e per la rutina (b).

La quantificazione della vitamina D e della rutina è stata effettuata tramite analisi HPLC eseguita utilizzando un cromatografo Beckman System Gold 126 Solvent Module (Beckman, Cassina de'

Pecchi, MI) equipaggiato di autocampionatore (Beckman System Gold 508 Autosampler) e di un rivelatore UV/VIS settato alla lunghezza d'onda di 264 nm per la vitamina D e 258 nm per la rutina. La separazione delle molecole è stata ottenuta utilizzando una colonna Phenomenex Synergi Fusion RP80 (4µm, 250x4,60 mm) mediante eluizione con una fase mobile, precedentemente degasata, rappresentata da una miscela ACN:MeOH (98:2 v/v) per la vitamina D e da una miscela di acido acetico (0,1% in acqua):ACN (75:25) per la rutina. Per l'analisi sono stati iniettati in colonna 25 µl ed il flusso è stato settato a 1 ml/min. Sono state realizzate due rette di taratura a 6 punti con concentrazione 50-1,56 mg/l per la quantificazione della vitamina D e 100-1,56 mg/l per la quantificazione della rutina. Il coefficiente di regressione calcolato è risultato pari a $R^2=0,9875$ per la vitamina D e $R^2=0,9998$ per la rutina (Fig. 20).

Una volta determinato il tenore in vit. D e rutina nelle microcapsule si è passati a determinare la *loading capacity (%)* utilizzando l'Eq (6):

$$LC \% = \frac{\text{massa composto bioattivo incapsulato}}{\text{massa polvere totale}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

In base a tale equazione la LC%, ovvero il quantitativo di vitamina D e di rutina presente nelle microcapsule, è risultata essere dell' 8,63% e dell' 1,7% nelle microcapsule ottenute utilizzando entrambi i composti bioattivi (ZC-VDR). La LC% della rutina nella formulazione ottenuta senza l'utilizzo della vitamina D (ZC-R) è risultata essere invece dell'1,56% (Tabella 9). Tali valori indicano come il processo di incapsulazione sia stato particolarmente efficiente, con rese mediamente molto più elevate di quanto riportato in letteratura per composti analoghi.

Tabella 9. Concentrazione e loading capacity di vitamina D e rutina nelle microcapsule prodotte.

Formulazione microcapsule	Vit. D		Rutina	
	Concentrazione (mg/g)	Loading capacity (%)	Concentrazione (mg/g)	Loading capacity (%)
ZC-R	--	--	$17,24 \pm 0,60$	1,56
ZC-VDR	$62,68 \pm 3,15$	8,63	$12,4 \pm 0,46$	1,70

ZC= zeina + chitosano; ZC-VDR= zeina + chitosano – vit. D e rutina; ZC-R = zeina + chitosano – rutina.

Le particelle sono state anche sottoposta ad analisi mediante microscopia a scansione elettronica (SEM) al fine di valutarne la morfologia e le dimensioni. A tale scopo le tre diverse polveri (controllo e 2 formulazioni) sono state atomizzate con oro mediante il MED 010 coater (Balzers, Milano) e, successivamente, sono state osservate mediante un microscopio a scansione elettronica (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Dalle immagini delle microcapsule (Figura 21) si può notare come la dimensione delle microcapsule sia nell'ordine dei μm , e ciò consentirebbe il loro impiego nella formulazione di creme spalmabili. La superficie delle microcapsule risulta essere integra e senza fori o interruzioni, il che garantirebbe il completo coating dei composti bioattivi preservandoli, di fatto, dall'ambiente esterno.

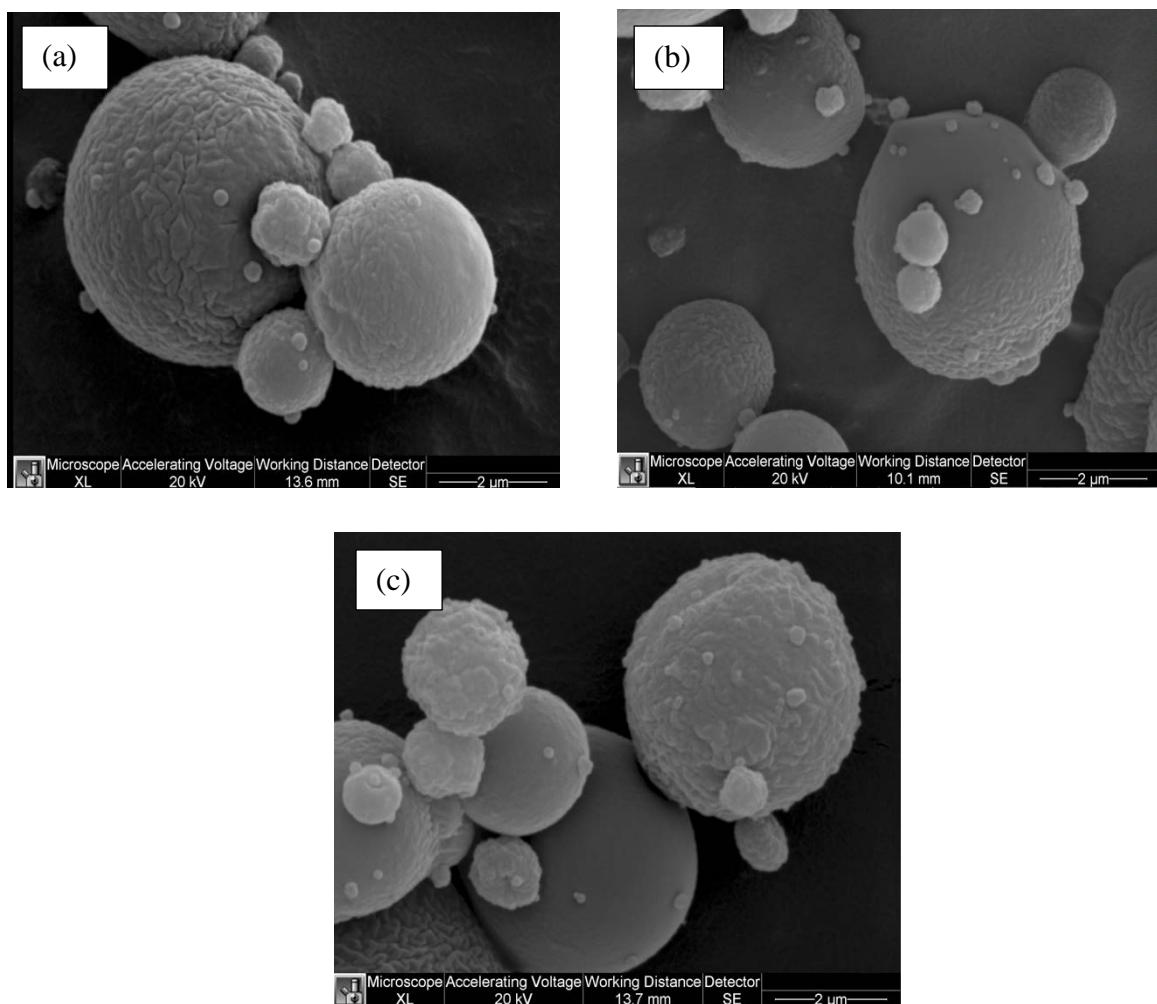


Figura 21. Immagini ottenute mediante il microscopio a scansione elettronica (x 5000) delle microcapsule. (a) ZC-VDR; (b) ZC-R; (c) ZC.

Peraltro l'elevato valore di loading capacity ottenuto dopo varie prove di realizzazione delle microcapsule non consentirebbe di utilizzarle tal quali perché la loro aggiunta in quantità dosabili a livello industriale porterebbe ad avere nelle creme finali un contenuto in vitamina D eccessivo. Infatti, pur considerando una assunzione giornaliera di soli 30 g di crema spalmabile si rischierebbe di superare abbondantemente il valore di assunzione giornaliera raccomandato dai nutrizionisti, rischiando di andare incontro a problemi di sovradosaggio, che nel caso della vitamina D sarebbero particolarmente severi, dato che è una vitamina liposolubile che si accumulerebbe nel tessuto adiposo umano con potenziali squilibri metabolici.

Come conseguenza occorrerebbe realizzare microcapsule con una concentrazione di vit. D decisamente minore anche tenendo conto del fatto che a livello industriale il processo di additivazione di un qualsiasi ingrediente è abbastanza complesso se si devono aggiungere pochi grammi a centinaia di kg di altri materiali ed assicurare al contempo una uniforme distribuzione nella massa dei principi attivi di interesse. Questo problema si amplifica nel caso di un prodotto come una crema spalmabile e tenendo conto anche dei tempi a disposizione per la realizzazione del progetto, in accordo con il partner industriale è stato deciso di orientare l'attività alla realizzazione di una crema spalmabile in cui l'addizione di vit. D fosse realizzata con un'altra metodologia.

Prove di fortificazione della crema spalmabile selezionata con la formulazione di tre referenze differenti

La crema spalmabile di partenza, ovvero la crema “Come tu mi vuoi”, è stata quindi fortificata con nanoparticelle di calcio e con vitamina D solubilizzata in olio di girasole. In particolare sono stati prodotti tre diversi campioni:

- (1) Crema alla nocciola fortificata con sola Vitamina D (CTMV-VD)
- (2) Crema alla nocciola fortificata con solo Mg-CaCO₃ (CTMV-Ca)
- (3) Crema alla nocciola fortificata con Vitamina D e Mg-CaCO₃ (CTMV-VDCa)

Come riportato in precedenza, le creme spalmabili sono state fortificate con una concentrazione tale da coprire il 30% dell'RDA (*Recommended Daily Allowance*) per ciascun composto bioattivo. Partendo da questo presupposto, è stato stabilito di fortificare la cioccolata spalmabile con 166 µg/kg di Vitamina D e con 11,6 g/kg di calcio. La crema spalmabile “Come tu mi vuoi” è stata

quindi riscaldata a 45 °C ed i composti bioattivi sono stati aggiunti e mescolati all'interno di una planetaria (Kenwood mod. KM096) per 45 min. Per quanto concerne l'aggiunta della vitamina D, questa è stata sciolta nell'olio di girasole (lo stesso grasso impiegato per la produzione della crema “Come tu mi vuoi”) riscaldato a 45 °C e filtrato. Grazie alle prove preliminari di solubilità della vitamina D nell'olio di girasole, si è arrivati ad una concentrazione tale (20 mg vit. D/100 g olio) che utilizzando 1 g di olio era possibile aggiungere alla crema spalmabile il quantitativo stabilito del composto bioattivo. L'aggiunta delle microparticelle di Mg-CaCO₃ è invece avvenuta previa setacciatura della polvere prodotta. Al fine di sottoporre tutti i campioni allo stesso stress termico e reologico, anche alla crema fortificata con solo Mg-CaCO₃ ed alla crema base di partenza, è stato aggiunto 1 g di olio di girasole.

Caratterizzazione delle creme fortificate

Della matrice alimentare di partenza (“Come tu mi vuoi” acronimo CTMV) e delle tre creme fortificate è stata valutata la viscosità, la granulometria, l'umidità, il colore e l'attività dell'acqua. Come è possibile evincere dalla Tabella 6, l'aggiunta dei composti ha causato un lieve, ma significativo incremento ($p < 0,05$) della granulometria delle creme, anche se il valore è rimasto in ogni caso inferiore alla soglia di 0,030 mm (limite di riconoscimento delle papille gustative). Ciò non sarebbe imputabile alle dimensioni delle nanoparticelle di Mg-CaCO₃ prodotte (\varnothing ca. 300 nanometri) quanto piuttosto ad una possibile loro aggregazione durante la fase di miscelazione. Riguardo i valori dell'umidità, le creme sperimentali non sono risultate differire dalla matrice di partenza mentre, valori statisticamente più alti dell' a_w sono stati osservati nelle creme spalmabili contenenti anche il calcio sotto forma di Mg-CaCO₃. Peraltro i valori di a_w sono sempre risultati abbondantemente inferiori al valore soglia per lo sviluppo di qualsiasi tipo di microrganismi ($a_w = 6$). L'aggiunta degli ingredienti bioattivi non ha invece effetto sui parametri considerati per la valutazione del colore.

Dal punto di vista reologico, le proprietà delle creme spalmabili sono influenzate soprattutto dalla particle size distribution (PSD) e dagli ingredienti. I valori più elevati, in termini di limite di scorrimento e viscosità, sono stati osservati nelle creme CTMV-VDCa e nella CTMV-Ca contenenti il Mg-CaCO₃. Anche in questo caso, tali valori non sarebbero imputabili alla granulometria della polvere aggiunta, quanto piuttosto a possibili fenomeni di agglomerazione.

Tabella 6. Valori relativi alla granulometria, all’umidità, all’attività dell’acqua (a_w), ai parametri reologici ed al colore delle creme spalmabili.

Crema spalmabile	Granulometria (mm)	Umidità (%)	a_w	Parametri reologici		Colore		
				Limite di scorrimento (Pa)	Viscosità (mPa s ⁻¹)	L*	a*	b*
CTMV	0,023±0,006 ^a	1,21±0,09 ^a	0,460±0,003 ^a	14,93±1,39 ^a	2415,07±101,96 ^a	35,82±1,12 ^a	8,78±0,40 ^a	14,05±1,16 ^a
CTMV-VD	0,024±0,005 ^a	1,27±0,03 ^a	0,458±0,000 ^a	14,80±0,55 ^a	2343,13 ±83,77 ^a	34,92±1,70 ^a	8,55±0,33 ^a	14,24±0,99 ^a
CTMV-VDCA	0,027±0,004 ^b	1,40±0,10 ^a	0,472±0,004 ^b	19,37±0,55 ^b	5105,30±150,30 ^b	35,68±0,35 ^a	9,08±0,80 ^a	14,8±1,66 ^a
CTMV-Ca	0,026±0,007 ^b	1,34±0,17 ^a	0,476±0,002 ^b	18,92±0,79 ^b	4445,06±108,12 ^c	34,91±1,00 ^a	8,56 ±0,23 ^a	13,72± 0,65 ^a

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCA crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

L*: luminosità; a*: rosso/verde; b*: giallo/blu

Per ogni colonna, valori con apici differenti sono significativamente diversi ($p<0,05$)

Bioaccessibilità dei composti fenolici e indice di degradazione della matrice

Come discusso nella prima parte della relazione, è importante offrire ai consumatori dei prodotti fortificati, ma è oltremodo importante anche poter essere sicuri che le sostanze aggiunte volontariamente agli alimenti siano poi bioaccessibili. Per questo nelle creme CTMV fortificate è stato determinato il contenuto in composti fenolici ed i risultati sono riportati in Figura 11. Il lieve trend alla diminuzione del tenore fenolico riscontrato nelle creme fortificate potrebbe essere legato, specialmente nel caso di addizione di calcio, ad un adsorbimento di tali composti da parte delle microparticelle di Mg-CaCO₃, caratterizzate da una elevata superficie specifica, che potrebbe rendere meno efficiente il processo di estrazione analitico dei fenoli, causando così una leggera riduzione delle rese di estrazione.

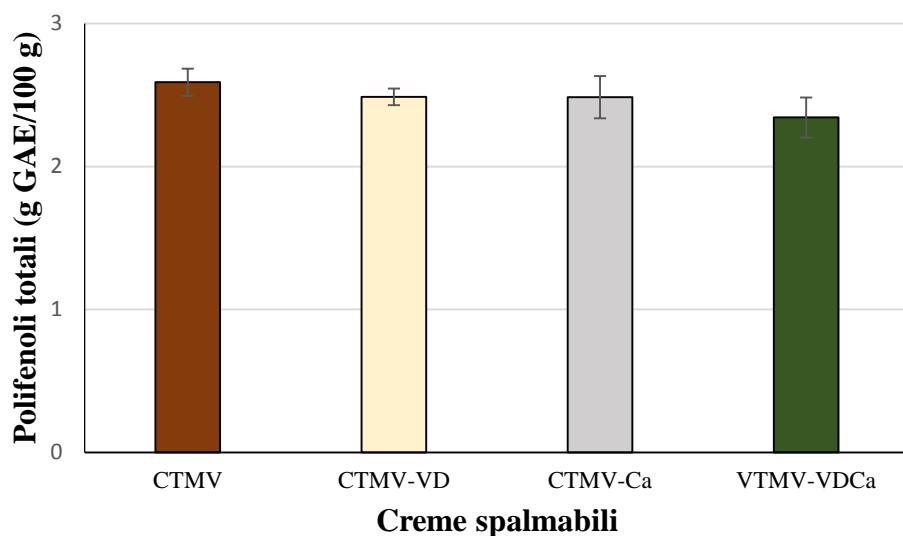


Figura 11. Concentrazione in polifenoli nelle creme spalmabili arricchite.

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Nell’ottica di valutare la bioaccessibilità, i campioni di crema fortificata sono stati sottoposti al processo di digestione *in vitro* ed in Figura 12 è riportato il tenore in polifenoli ritrovato nel digestato salivare, gastrico ed intestinale dei campioni di cioccolata spalmabile fortificata. Diversi fattori, come la distruzione meccanica, la natura della matrice alimentare, il tempo di residenza in diverse condizioni gastrointestinali e l’azione enzimatica contribuiscono positivamente al rilascio fisico-chimico dei composti fenolici, con conseguente aumento del contenuto totale di polifenoli liberi. Come si può osservare, lo stadio orale, caratterizzato dall’idrolisi primaria dei glucidi da

parte dell' α -amilasi, ha determinato un alto rilascio di polifenoli. Il pH acido, caratteristico dell'ambiente gastrico, determina invece una forte riduzione del rilascio in polifenoli che tendenzialmente aumentano con il variare del pH verso le condizioni neutro-alcaline caratteristiche della fase intestinale. È importante sottolineare come il metodo di quantificazione dei polifenoli valuti solo i polifenoli solubili. Secondo questi risultati, sembra che parte dei polifenoli presenti nelle matrici analizzate prendano parte a molecole complesse prima della digestione, liberandosi da queste strutture in condizioni intestinali. Negli alimenti, i polifenoli si trovano principalmente come esteri, glicosidi e polimeri di solito non assorbibili in quelle forme, e quindi devono essere idrolizzati da enzimi digestivi o microflora intestinale. A causa del basso pH nello stomaco, gli oligomeri flavonoidi vengono trasformati in unità più piccole. I flavon-3-oli passano intatti al duodeno sotto forma di agliconi. Nell'intestino tenue si determinano invece fenomeni di deglicosilazione, metilazione, sulfonazione e idrossilazione dei flavonoidi. In condizioni di pH alcalino nell'intestino tenue, si verifica l'assorbimento di acidi fenolici liberi. I polifenoli non digeriti passano quindi nell'intestino crasso, dove la microflora colica li degrada in acidi fenolici (Paz-Yépez et al., 2019).

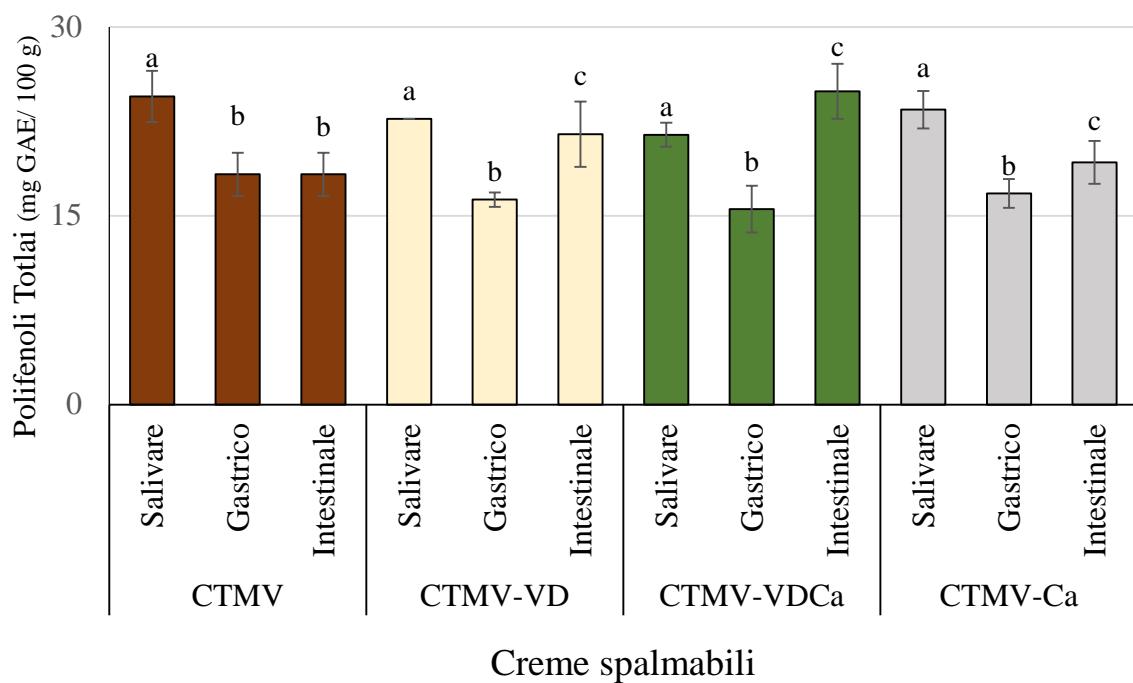


Figura 12. Quantitativo di polifenoli totali rilevato durante la diverse fasi del processo digestivo delle varie creme spalmabili. Apici diversi per ciascuna fase indicano differenze significative per singolo campione ($p<0,05$).

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Come riportato anche in precedenza, l'indice di degradazione della matrice (MDI) corrisponde alla percentuale di particelle digerite e fornisce informazioni globali sull'entità dei diversi processi subiti dalla matrice alimentare durante le fasi salivare, gastrica e intestinale quale, ad esempio, la solubilizzazione, e gli effetti delle reazioni chimiche o enzimatiche. Durante la digestione, il cibo assorbe una quantità significativa di acqua che, insieme all'azione degli enzimi digestivi, favorisce l'ammorbidimento della matrice e la riduzione delle forze coesive; a seconda della composizione della matrice alimentare e della struttura, ciò comporterà un diverso tasso di degradazione. Nei campioni analizzati non si evince una differenza nell'MDI, segno che, i componenti bioattivi aggiunti si amalgano bene con i costituenti la matrice di partenza senza creare nuovi aggregati o struttura particolarmente resistenti (Fig.13). Ciò potrebbe essere ascritto sia alle piccole quantità di vitamina D utilizzate e perfettamente solubilizzate all'interno della fase grassa, sia alle piccole dimensioni del Mg-CaCO₃ che non influiscono sulla struttura della matrice.

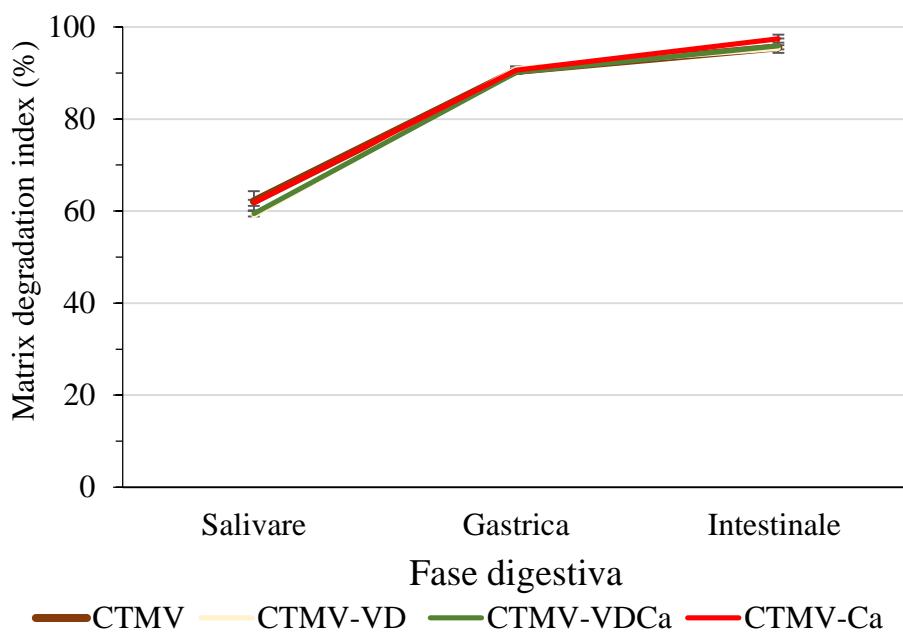


Figura 13. Matrix degradation index (%) delle creme spalmabili alla nocciola.

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Concentrazione dei minerali

Nelle creme spalmabili fortificate con calcio e vitamina D sono stati identificati e quantificati diversi minerali: sodio (Na), magnesio (Mg), fosforo (P), potassio (K), calcio (Ca), manganese

(Mn), ferro (Fe), rame (Cu) e zinco (Zn). Dalla Figura 14 si evincono differenze significative nella concentrazioni dei minerali là dove il Mg-CaCO₃ è stato usato per la fortificazione. È possibile infatti osservare un aumento di 4,4 e di 4,6 volte della concentrazione del calcio e di 2,6 e 2,7 volte nella crema CTMV-Ca e CTMV-VDCa rispetto alla formulazione base. Quindi il processo di fortificazione con il calcio è risultato efficiente, essendo il Ca adeguatamente incorporato nella nuova matrice realizzata.

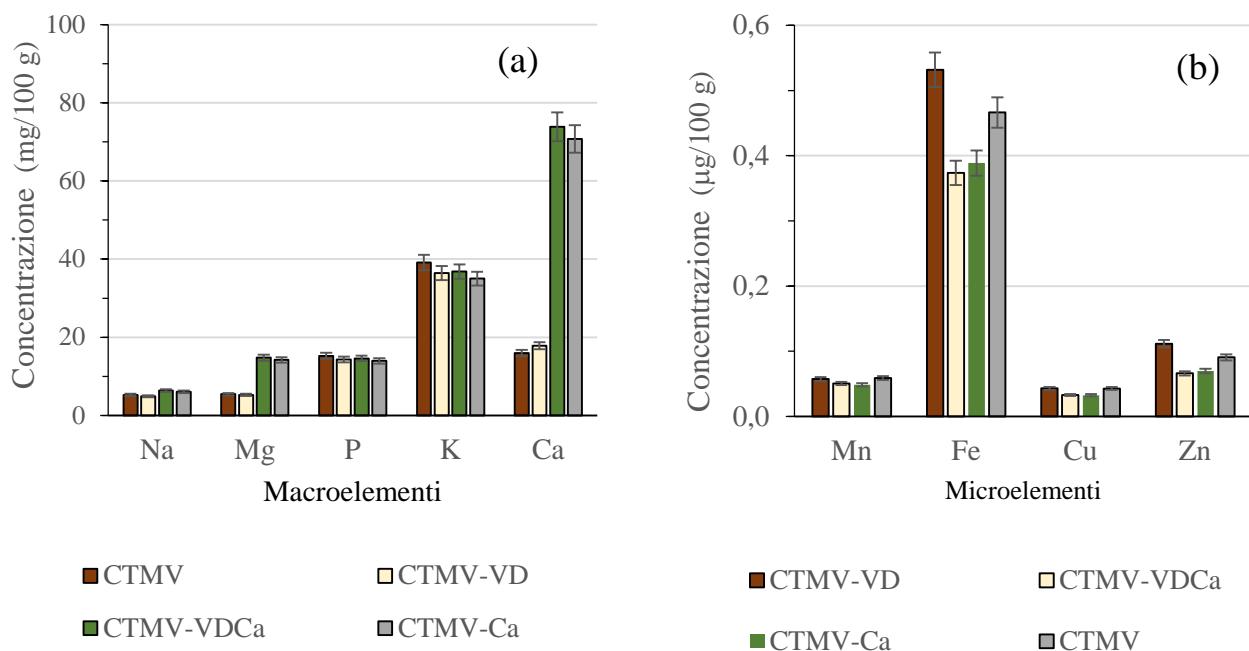


Figura 14. Concentrazione di macro- (a) e micro- (b) elementi nelle varie creme spalmabili. CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDC crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Test di shelf-life accelerata (Accelerated Shelf Life Testing - ASLT)

Anche sulle creme fortificate con calcio e vitamina D è stata effettuata una stima della shelf-life ed in Figura 15 sono riportati i dati relativi all’ossidazione primaria delle creme stoccate alla temperatura di 15, 30, 40 e 50 °C. Come si evince dai grafici, per tutte le formulazioni considerate la produzione di perossidi segue una cinetica di primo ordine. Il valore dei perossidi, espresso in mEq O₂/kg di grasso, aumenta più velocemente man mano che aumenta la temperatura di stoccaggio. Andando a plottare il ln del valore del coefficiente angolare di ciascuna curva riportata in Figura 14 in funzione di 1/T, ovvero del reciproco della temperatura di stoccaggio espressa in K,

si ottiene il valore dell'energia di attivazione (Ea) di ogni singola reazione. L'Ea della reazione di ossidazione primaria delle singole creme spalmabili è risultata essere 11,55 KJ/mol K per la crema "Come tu mi vuoi", 12,04 KJ/mol K per la CTMV-VD, 12,99 KJ/mol K per la CTMV-VDCa e 12,83 KJ/mol K per la CTMV-Ca.

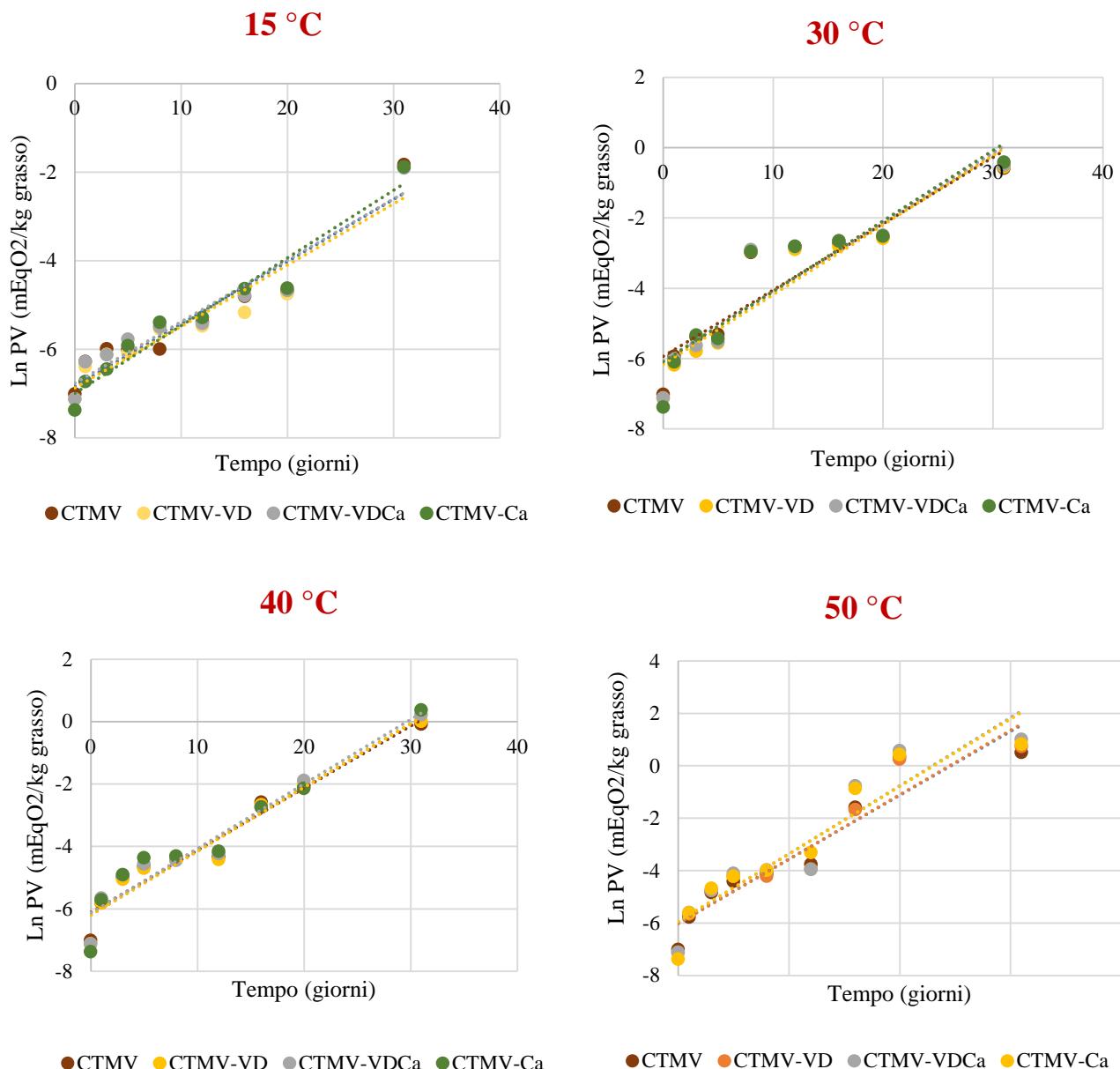


Figura 15. Andamento dell'ossidazione primaria delle creme spalmabili alla nocciola a 15, 30, 40 e 50°C.

CTMV crema spalmabile "Come tu mi vuoi"; CTMV-VD crema spalmabile "Come tu mi vuoi" fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile "Come tu mi vuoi" fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile "Come tu mi vuoi" fortificata con calcio.



Peraltro va sottolineato come la maggiore ossidabilità dei campioni fortificati potrebbe essere ascrivibile al fatto che i tali campioni sono stati realizzati utilizzando un sistema di miscelazione in cui non è stato possibile impedire il contatto del prodotto con l'ossigeno dell'aria. Conseguentemente alcuni processi ossidativi potrebbero avere avuto già inizio, andando a ridurre la potenziale shelf-life delle creme fortificate. A livello industriale questa problematica potrebbe essere limitata o risolta completamente lavorando sotto un battente di gas inerte, quale ad esempio l'azoto, analogamente a quanto viene in alcuni casi fatto durante la gramolatura della pasta di olive prima dell'estrazione dell'olio.

I dati sperimentali hanno quindi consentito di procedere alla realizzazione della predizione della shelf-life del prodotto. Applicando l'equazione di Arrhenius (Eq.4) è stato possibile ottenere il valore k che, sostituito all'Eq. (2) ha consentito di definire la potenziale shelf-life dei prodotti. In Tabella 7 sono riportati i valori della costante k come calcolati alle varie temperature sperimentali, nonché la shelf-life stimata alle stesse temperature e alle temperature potenziali di stoccaggio di 20 e 25 °C.

La shelf-life per tutte le creme spalmabili diminuisce, ovviamente, all'aumentare della temperatura, e per tutte e quattro le formulazioni la shelf-life residua a 20-25 °C è di circa 2 mesi che andrebbero sommati ai circa 5 mesi già trascorsi dalla data di produzione della crema spalmabile stessa. Ciò porterebbe la shelf life potenziale dei prodotti a circa 7 mesi.

Relativamente alla formazione di composti secondari dell'ossidazione, anche procedendo alla fortificazione delle creme non si è potuta osservare una significativa presenza di tali composti nei prodotti. All'analisi le varie creme fortificate non hanno mostrato significative variazioni del valore di p-anisidina sia in funzione del tempo che della temperatura rispetto alla crema di riferimento, ed il massimo valore di pAV è risultato essere circa 4, ben inferiore al valore limite di 20 (limite riportato in rosso nella Figura 16).

Tabella 7. Stima della shelf-life delle creme spalmabili alle temperature sperimentali (15, 30, 40 e 50 °C) e alle temperature commerciali di stoccaggio di 20 e 25 °C.

Crema	k_0	T (°C)	k	Shelf-life (giorni)
CTMV	17,68	15	0,1422	65,52
		30	0,1805	51,60
		40	0,2090	44,57
		50	0,2397	38,85
		20	0,1543	60,34
		25	0,1671	55,73
CTMV-VD	21,79	15	0,1429	67,70
		30	0,1833	52,79
		40	0,2135	45,31
		50	0,2464	39,27
		20	0,1557	62,14
		25	0,1691	57,19
CTMV-VDCa	32,07	15	0,1414	66,63
		30	0,1850	50,94
		40	0,2181	43,21
		50	0,2546	37,02
		20	0,1551	60,74
		25	0,1697	55,54
CTMV-Ca	14,11	15	0,1534	61,44
		30	0,1919	49,11
		40	0,2201	42,81
		50	0,2504	37,64
		20	0,1657	56,87
		25	0,1785	52,79

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

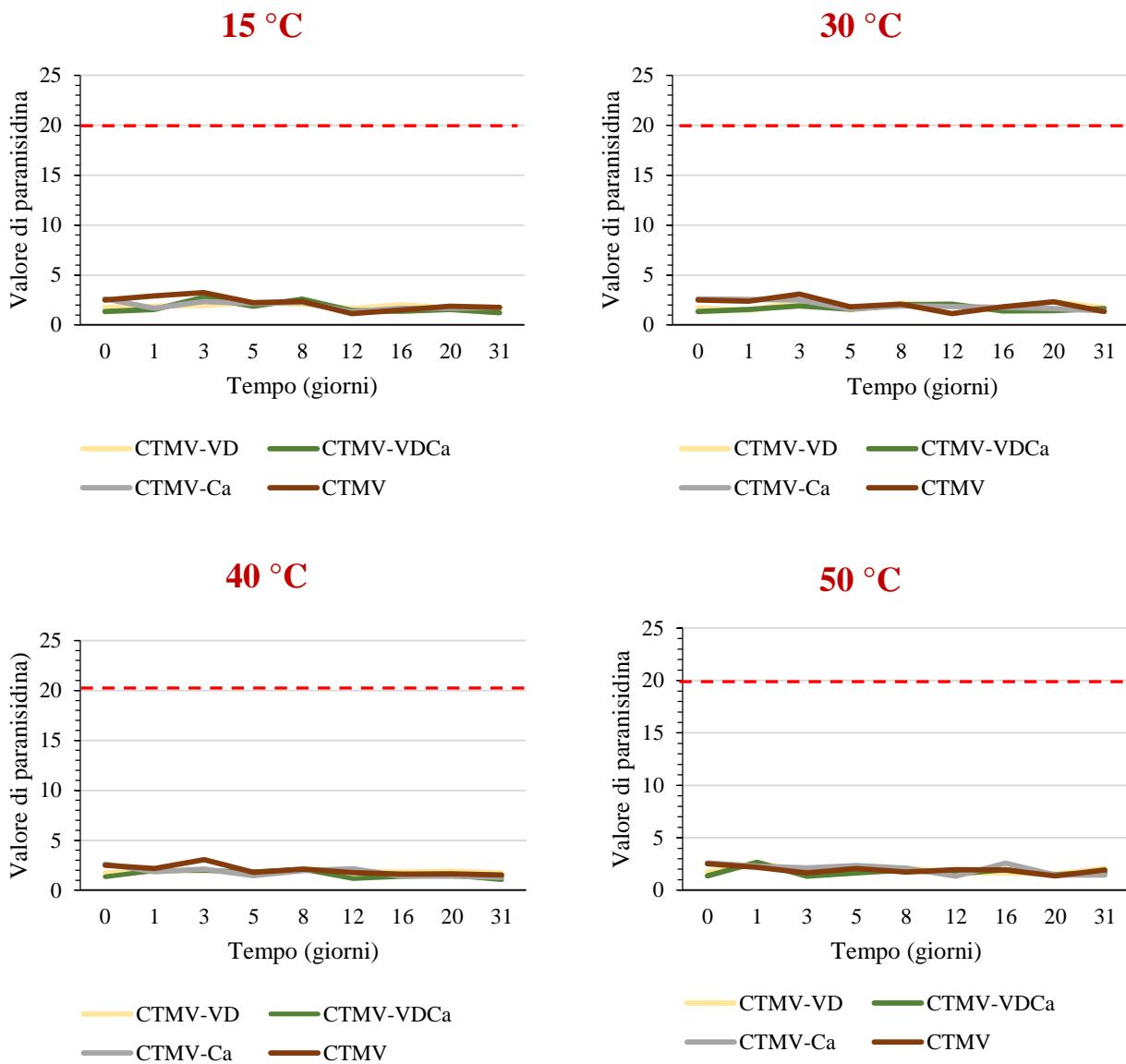


Figura 16. Valore di parnisidina delle creme spalmabili nel tempo.

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCA crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Analisi sensoriale e accettabilità del prodotto

I dati relativi all’analisi sensoriale effettuata sulla crema spalmabile selezionata e sulle tre tipologie di fortificazione proposta (Vitamina D/Vitamina D e Mg-CaCO₃/ Mg-CaCO₃) sono riportati in Figura 17.

Nel caso della crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D (CTMV-VD) non si

sono evidenziate differenze significative per tutti gli attributi presi in considerazione rispetto alla crema di partenza. Nel caso dell'aggiunta di calcio nella formulazione, la presenza di questo elemento determina un peggioramento della percezione di molti degli attributi selezionati, ed in particolar modo la *texture* del prodotto e l'*aspetto* sono i descrittori che risultano essere maggiormente penalizzati. Per quanto riguarda il gradimento generale le creme contenenti calcio si differenziano negativamente dalle altre due, anche se il punteggio ottenuto dalla CTMV-Ca e dalla CTMV-VDCa è risultato, rispettivamente, pari a 6,92 e 7,45, valori in ogni caso ben superiori al valore soglia di gradimento pari a 6. Va sottolineato come il valore di gradimento generale per la crema CTMV-VDCa (7,45) sia in ogni caso molto vicino a quello ottenuto dalla Nutella (7,87) in un analogo test sensoriale. Si può quindi concludere che la presenza del calcio impatta sul prodotto, seppure senza comprometterne sostanzialmente l'accettabilità.

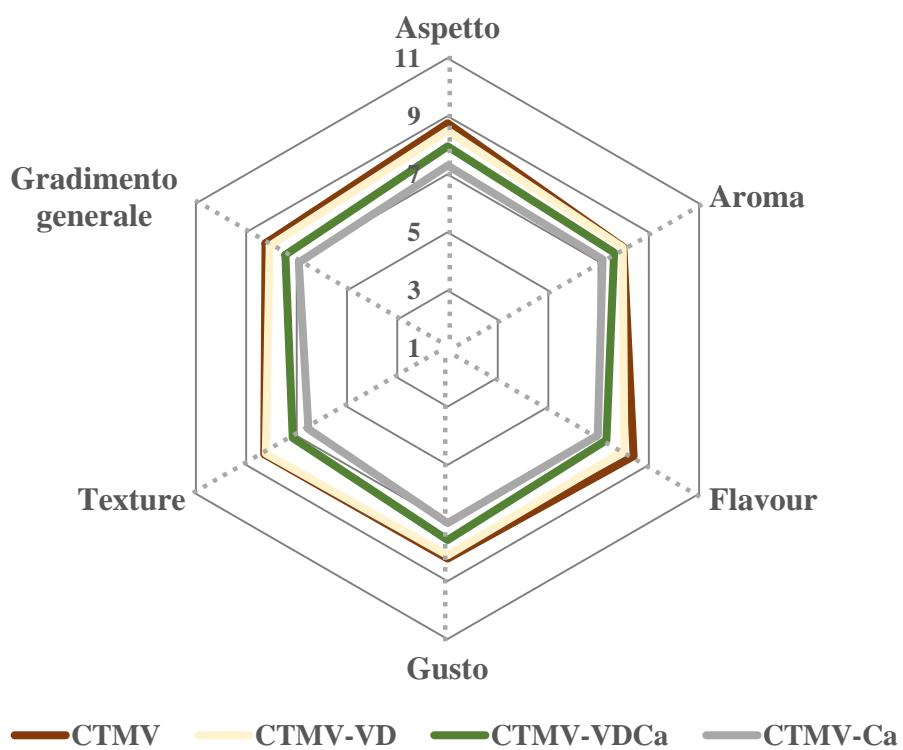


Figura 17. Valutazione sensoriale delle creme spalmabili.

CTMV crema spalmabile “Come tu mi vuoi”; CTMV-VD crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D; CTMV-VDCa crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con vitamina D e calcio; CTMV-Ca crema spalmabile “Come tu mi vuoi” fortificata con calcio.

Un elemento importante nei confronti dei consumatori è però *l'informazione* che viene loro fornita rispetto alle caratteristiche del prodotto alimentare che viene loro proposto. E' stato riportato in

letteratura come la conoscenza di effetti benefici di sostanze addittive ad un prodotto alimentare possa portare i consumatori a orientarsi più favorevolmente all'acquisto di tali prodotti. Conseguentemente al fine di valutare se i prodotti fortificati realizzati avrebbero avuto una possibilità di successo a livello commerciale, e valutarne anche il prezzo potenziale che gli acquirenti sarebbero stati disposti a pagare, sono stati condotti due specifici test. In particolare si è proceduto ad acquisire informazioni relative alla disponibilità all'acquisto (Willingness to buy-WTB) e alla propensione al pagamento da parte del consumatore (Willingness to pay-WTP) delle creme spalmabili fortificate. Tale tipologia di informazione è fondamentale nell'aiutare un produttore ad orientarsi nella produzione e nella commercializzazione di nuovi prodotti.

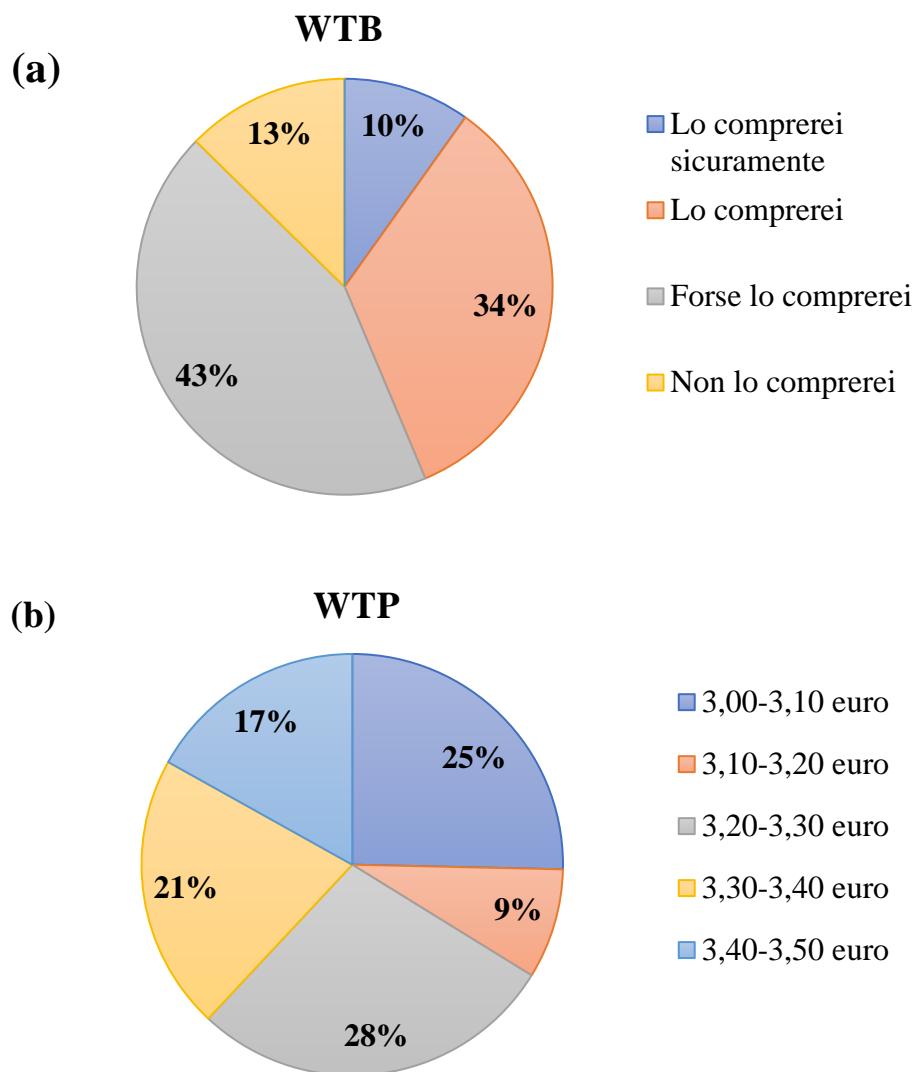


Figura 18. (a) Disponibilità all'acquisto (Willingness To Buy-WTB) e (b) disponibilità a pagare (Willingness To Pay-WTP) della crema alla nocciola fortificata con Vitamina D e Mg-CaCO₃

L'indagine è stata condotta al termine della valutazione sensoriale delle creme prodotte, e per quanto concerne il WTB è stato chiesto di indicare, su una scala strutturata da 1 a 5 (1= non lo comprerei e 5= decisamente lo comprerei) se trovando la crema spalmabile fortificata con vitamina D e calcio sugli scaffali l'avrebbero acquistata. Per il test WTP sono state proposte 5 opzioni per comprendere quanto un consumatore medio fosse disposto a pagare per il prodotto. Partendo da un valore di 3 euro che rappresenta il reale prezzo medio di mercato di una crema alla nocciola da 330 g, le scelte sono state strutturate indicando i seguenti valori di prezzo in euro: a) 3,00- 3,10; b) 3,10- 3,20; c) 3,20-3,30; d) 3,30-3,40; e) 3,40-3,50.

Le analisi sono state condotte sull'assunto che in etichetta fossero riportate le informazioni sulle proprietà salutistiche delle varie formulazioni e dai grafici riportati in Figura 18, si evince come oltre l'80% dei partecipanti all'analisi sensoriale sarebbe propenso ad acquistare tale prodotto e il 66% dei consumatori sarebbe disposto a spendere dal 10 al 15% in più per questa nuova referenza. I risultati di questi test confermano come nell'attuale situazione di mercato i consumatori cerchino, anche nei prodotti non indispensabili, elementi legati al mantenimento o al miglioramento del loro stato di salute con disponibilità a riconoscere un prezzo d'acquisto più alto per queste referenze. Questo tipo di test risulta quindi indispensabile a livello aziendale perché consente ad un produttore di conoscere il margine entro il quale può muoversi, anche relativamente al costo degli ingredienti usati nelle formulazioni e all'indispensabile margine di profitto che deve realizzare.

Conclusioni

Negli ultimi anni si sta assistendo ad un cambiamento riguardo l'attenzione che i consumatori hanno nei confronti del cibo. Gli alimenti vengono visti sempre più come fonte di benessere, e la scelta dei prodotti diventa sempre più selettiva, indirizzandosi soprattutto su quelli che sono alimenti salutistici.

Le creme spalmabili alla nocciola, per loro natura, nascono come un prodotto ricco sia in zuccheri che in grassi, elementi indispensabili per poter conferire loro le tipiche proprietà reologiche e sensoriali. Tuttavia, essendo un *comfort food*, e un alimento molto appetibile soprattutto per i più giovani, potrebbero rappresentare una matrice interessante per un'eventuale fortificazione con composti bioattivi. Pertanto, la realizzazione di creme più salutistiche potrebbe rappresentare una soluzione per soddisfare i bisogni edonistici dei consumatori senza andare ad acuire le

problematiche sanitarie che oggi si presentano in maniera sempre più massiccia.

La realizzazione del progetto ha avuto come base essenziale il rapporto sinergico che si è venuto ad instaurare fra l’Università di Verona ed il partner industriale, la Socado srl, primario produttore di creme alla spalmabili che opera sul mercato nazionale ed internazionale, cui si sono aggiunte le expertise fornite da docenti dell’Università della Basilicata e da un docente di levatura internazionale proveniente dall’Università di Wolwerhampton (Inghilterra). Tale rapporto di collaborazione fra i vari attori del progetto ha consentito di arrivare alla realizzazione di un prototipo di crema spalmabile alla nocciola fortificata che potrebbe trovare un’adeguata collocazione nell’attuale mercato dei prodotti alimentari.

Nell’ambito della realizzazione del progetto, si è dapprima prodotta e caratterizzata dal punto di vista chimico-fisico e sensoriale una crema alla nocciola senza zuccheri aggiunti e senza olio di palma, confrontandola inoltre con due referenze già presenti sul mercato, e successivamente si è proceduto alla fortificazione e alla caratterizzazione della stessa con vitamina D e calcio. Poiché nelle creme spalmabili è molto importante che la granulometria degli ingredienti non superi i 30 micrometri al fine di non impattare negativamente sul *mouthfeel* e sulla *texture*, mediate la tecnica della co-precipitazione sono state sintetizzate delle nanoparticelle di Mg-Ca CO₃ con una granulometria minore di 300 nm. Si è quindi proceduto ad effettuare varie prove di formulazione ed ottimizzazione della crema, e in stretta collaborazione con il Responsabile R&D della Socado srl è stato deciso di orientarsi verso la produzione di una crema spalmabile senza zuccheri e senza olio di palma fortificata con vitamina D e calcio. Peraltra un elemento importante per poter presentare sul mercato un prodotto innovativo fortificato è quello di valutarne il reale potenziale impatto sulla salute del consumatore, ed in base alle analisi effettuate l’assunzione di una singola porzione della crema spalmabile realizzata consentirebbe di coprire il 30% del fabbisogno giornaliero di Vitamina D e calcio.

La crema spalmabile ottenuta è risultata stabile dal punto di vista ossidativo con una shelf life del tutto paragonabile a quella del prodotto non fortificato. Tuttavia per verificarne il reale potenziale successo sul mercato, il prodotto è stato sottoposto anche a valutazione sensoriale, utilizzando un panel con un elevato numero di giudici, consumatori abituali di creme spalmabili alla nocciola. I risultati della valutazione, condotta senza aver fornito alcuna informazione specifica ai panelisti, sono stati molto positivi, in quanto il prodotto realizzato ha ricevuto un punteggio di accettabilità sostanzialmente identico a quello ottenuto da un prodotto analogo, ma non fortificato, leader di mercato nel segmento delle creme spalmabili alla nocciola. Inoltre, una volta fornita l’informazione



sulla fortificazione della crema e dei potenziali effetti benefici sulla salute, tramite l'impiego di specifici tests (WTB – Willingness To Buy e WTP – Willingness To Pay) si è potuto evidenziare come oltre l'80% dei partecipanti all'analisi sensoriale acquisterebbe il nuovo prodotto loro proposto ed il 66% sarebbe disposto a spendere dal 10 al 15% in più per questa nuova referenza. E' da evidenziare come nei confronti dei consumatori l'informazione giochi un ruolo determinante, guidandone le scelte anche verso prodotti che si discostano da quelli cui tradizionalmente sono abituati a consumare.

Durante questo progetto è stata esplorata anche la possibilità di microincapsulare la vitamina D mediante la tecnica di precipitazione indotta da antisolvente seguita dalla rimozione dell'acqua. Dopo varie prove sperimentali, tese a verificare quale tipologia di microincapsulato si riuscisse ad ottenere con sufficienti valori di *loading*, sono stati raggiunti risultati incoraggianti, con la realizzazione di una polvere il cui dosaggio possa essere potenzialmente realizzabile a livello industriale durante la miscelazione con gli ingredienti che costituiscono la crema spalmabile. Peraltro il passaggio di scala, per la trasposizione del processo di produzione a livello industriale e la realizzazione dei quantitativi richiesti per l'ottenimento di una crema spalmabile fortificata a livello industriale, necessita di ulteriori approfondimenti.

In ultimo occorre sottolineare come per l'assegnista coinvolto nel progetto il doversi confrontare con un'importante realtà industriale, operando in un ambito notevolmente diverso da quello universitario, con tempi e modalità di lavoro significativamente differenti, abbia rappresentato un momento molto significativo ed fondamentale per la sua crescita professionale. Infatti, operando anche su impianti industriali l'assegnista ha potuto acquisire conoscenze e competenze che possono rappresentare un elemento basilare per il suo definitivo ingresso nel mondo del lavoro.

Bibliografia

Adami, S., Bertoldo, F., Braga, V., Fracassi, E., Gatti, D., Gandolini, G., & Rini, G. B. (2009). 25-hydroxy vitamin D levels in healthy premenopausal women: association with bone turnover markers and bone mineral density. *Bone*, 45(3), 423-426.

Adami, S., Romagnoli, E., Carnevale, V., Scillitani, A., Giusti, A., Rossini, M., & Minisola, S. (2011). Linee guida su prevenzione e trattamento dell'ipovitaminosi D con colecalciferolo. *Reumatismo*, 63(3), 129-147.

Aidoo, R. P., Depypere, F., Afoakwa, E. O., & Dewettinck, K. (2013). Industrial manufacture of sugar-free chocolates—applicability of alternative sweeteners and carbohydrate polymers as raw



materials in product development. *Trends in food science & technology*, 32(2), 84-96.

AOAC. 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Armas, L. A., Hollis, B. W., & Heaney, R. P. (2004). Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5387-5391.

Aydin, S., & Özdemir, Y. (2017). Development and characterization of carob flour based functional spread for increasing use as nutritious snack for children. *Journal of Food Quality*, 2017.

Ballard, J. M., Zhu, L., Nelson, E. D., & Seburg, R. A. (2007). Degradation of vitamin D3 in a stressed formulation: the identification of esters of vitamin D3 formed by a transesterification with triglycerides. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(1), 142-150.

Federal Register (2016). Rules and Regulations, 81 (103), 33982.

Furlán, L. T. R., Baracco, Y., Lecot, J., Zaritzky, N., & Campderrós, M. E. (2017). Influence of hydrogenated oil as cocoa butter replacers in the development of sugar-free compound chocolates: Use of inulin as stabilizing agent. *Food chemistry*, 217, 637-647.

Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.

Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of food science*, 75(1), R50-R57.

Jackson, R. D., LaCroix, A. Z., Gass, M., Wallace, R. B., Robbins, J., Lewis, C. E., ... & Bonds, D. E. (2006). Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *New England Journal of Medicine*, 354(7), 669-683.

Katsuda, M. S., McClements, D. J., Miglioranza, L. H., & Decker, E. A. (2008). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with β -lactoglobulin and pectin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(14), 5926-5931.

Konar, N. (2013). Influence of conching temperature and some bulk sweeteners on physical and rheological properties of prebiotic milk chocolate containing inulin. *European Food Research and Technology*, 236(1), 135-143.

Lamothe, S., Corbeil, M. M., Turgeon, S. L., & Britten, M. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & function*, 3(7), 724-731.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémesy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79,727-747.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Dufour, C. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.

Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they?. *The Journal of nutrition*, 129(7), 1402S-1406S.

Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of functional foods*, 52, 196-203.

Piergiovanni, L., & Limbo, S. (2010). *Food packaging: Materiali, tecnologie e soluzioni*. Springer Science & Business Media.

Ponginebbi, L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (1999). Oxidation of linoleic acid in emulsions: effect of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(1), 131.

Racolta, E., Muste, S., Muresan, A. E., Muresan, C. C., Bota, M. M., & Muresan, V. (2014). Characterization of Confectionery Spreadable Creams Based on Roasted Sunflower Kernels and Cocoa or Carob Powder. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 71(1), 62-67.

Regolamento (CE) N. 1925/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti.

Ribeiro, A. P. B., Grimaldi, R., Gioielli, L. A., & Gonçalves, L. A. (2009). Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. *Food research international*, 42(3), 401-410.

Robertson, G.L. (1993). *Food Packaging, Principle and Practice*. Marcel Dekker Inc, (publ.), New York

Ross K. (2014). Concepts important in understanding the health benefits of phenolics in fruits and vegetables: extractables and non-extractables phenolics and the influence of cells wall polysaccharides on bioaccessibility and bioavailability. *Research in Health and Nutrition*, 2, 29-43.

Rossini, K., Noreña, C. P., & Brandelli, A. (2011). Changes in the color of white chocolate during storage: potential roles of lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions. *Journal of food science and technology*, 48(3), 305-311.

Rubio L., Macia A., Castell-Auvì A., Pinent M., Blay M.T., Ardèvol A., Romero M.P., Motilva J. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chemistry*, 149, 277-84.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goni, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.

Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxidative values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.



Sims, R. J., Fioriti, J. A., & Trumbetas, J. (1979). Effect of sugars and sugar alcohols on autoxidation of safflower oil in emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(8), 742-745.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.

Talbot, G. (2009). Fats for confectionery coatings and fillings. In *Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products* (pp. 53-79). Woodhead Publishing.

Wang, L., Manson, J. E., Song, Y., & Sesso, H. D. (2010). Systematic review: vitamin D and calcium supplementation in prevention of cardiovascular events. *Annals of internal medicine*, 152(5), 315-323.

Yamauchi, R., Aoki, Y., Sugiura, T., Kato, K., & Ueno, Y. (1982). Effect of sugars and sugar analogs on autoxidation of methyl linoleate and safflower oil. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(12), 2997-3002.



ALLEGATI

**REGOLAMENTO (CE) N. 1925/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO
del 20 dicembre 2006**

sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti

IL PARLAMENTO EUROPEO E IL CONSIGLIO DELL'UNIONE
EUROPEA,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea, in particolare
l'articolo 95,

vista la proposta della Commissione,

visto il parere del Comitato economico e sociale europeo (1),

deliberando secondo la procedura di cui all'articolo 251 del trattato (2),

considerando quanto segue:

(1) Esiste un'ampia gamma di sostanze nutritive e altri ingredienti che possono essere utilizzati nella preparazione degli alimenti, in particolare, ma non in via esclusiva, vitamine, minerali, microelementi, amminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre, varie piante e estratti di erbe. La loro aggiunta agli alimenti è disciplinata negli Stati membri da differenti norme nazionali che ostacolano la libera circolazione di tali prodotti e instaurano condizioni di concorrenza diseguali, con dirette ripercussioni sul funzionamento del mercato interno. È pertanto necessario adottare norme comunitarie che armonizzino le disposizioni nazionali relative all'aggiunta di vitamine e di minerali e di talune altre sostanze agli alimenti.

(2) Il presente regolamento è inteso a disciplinare l'aggiunta di vitamine e di minerali agli alimenti, nonché l'utilizzazione di talune altre sostanze o ingredienti che contengono sostanze diverse dalle vitamine o dai minerali che sono aggiunti agli alimenti o utilizzati nella produzione di alimenti in condizioni tali da comportare un'ingestione di quantità ampiamente superiori a quelle che ci si può ragionevolmente aspettare di ingerire in condizioni normali di consumo nell'ambito di una dieta equilibrata e variata, e/o tali da rappresentare per altri motivi un rischio potenziale per i consumatori. In mancanza di norme comunitarie specifiche relative al divieto o alla limitazione dell'uso di sostanze o ingredienti che contengono sostanze diverse dalle vitamine o dai minerali, ai sensi del presente regolamento o di altre disposizioni comunitarie specifiche, possono applicarsi le pertinenti norme nazionali, fatte salve le disposizioni del trattato.

(1) GU C 112 del 30.4.2004, pag. 44.

(2) Parere del Parlamento europeo del 26 maggio 2005 (GU C 117 E del 18.5.2006, pag. 206), posizione comune del Consiglio dell'8 dicembre 2005 (GU C 80 E del 4.4.2006, pag. 27) e posizione del Parlamento europeo del 16 maggio 2006 (non ancora pubblicata nella Gazzetta ufficiale). Decisione del Consiglio del 12 ottobre 2006.

(3) Alcuni Stati membri esigono, per motivi di sanità pubblica, l'aggiunta obbligatoria di alcune vitamine e minerali ad alcuni alimenti di uso corrente. Questi motivi di sanità pubblica possono essere pertinenti a livello nazionale o anche regionale, ma non giustificherebbero attualmente l'armonizzazione dell'aggiunta obbligatoria degli elementi nutritivi in questione all'interno della Comunità. Tuttavia, se ciò dovesse risultare opportuno, disposizioni di questo tipo potrebbero essere adottate a livello comunitario. Nel frattempo, sarebbe utile raccogliere informazioni su queste misure nazionali.

(4) Vitamine e minerali possono essere aggiunti volontariamente agli alimenti dai fabbricanti di generi alimentari o devono esservi aggiunti in quanto sostanze nutritive in applicazione della legislazione comunitaria specifica. Possono inoltre essere aggiunti a fini tecnologici in quanto additivi, coloranti, aromi o per altre utilizzazioni, come ad esempio le prassi e procedure enologiche autorizzate secondo la legislazione comunitaria pertinente. Il presente regolamento dovrebbe applicarsi fatte salve le norme comunitarie specifiche concernenti l'aggiunta o l'utilizzazione di vitamine e minerali in prodotti o in gruppi di prodotti specifici o la loro aggiunta per fini diversi da quelli previsti dal presente regolamento.

(5) Considerando che le norme particolareggiate relative agli integratori alimentari contenenti vitamine e minerali sono state adottate dalla direttiva 2002/46/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 10 giugno 2002, per il ravvivamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari (3), le disposizioni del presente regolamento relative a vitamine e minerali non si applicano agli integratori alimentari.

(6) I produttori aggiungono vitamine e minerali agli alimenti per varie finalità, fra cui quella di reintegrarne il tenore, laddove esso sia stato ridotto durante le procedure di produzione, magazzinaggio o trattamento, o di dare a tali alimenti un valore nutrizionale analogo a quello degli alimenti che intendono sostituire.

(3) GU L 183 del 12.7.2002, pag. 51. Direttiva modificata dalla direttiva 2006/37/CE della Commissione (GU L 94 dell'1.4.2006, pag. 32).

(7) In circostanze normali, una dieta adeguata e variata è in grado di fornire, nelle quantità in linea con quelle considerate idonee e raccomandate da studi scientifici generalmente riconosciuti, tutti gli elementi necessari al normale sviluppo e al mantenimento in buona salute dell'organismo. Le indagini indicano, tuttavia, che tale situazione ideale non trova riscontro pratico né per tutte le vitamine e i minerali né presso tutti i gruppi di popolazione della Comunità. Gli alimenti a cui sono stati aggiunti minerali e vitamine sembrano apportare un contributo apprezzabile all'assunzione di queste sostanze nutritive, per cui si può ritenere che contribuiscano positivamente all'assunzione complessiva di tali sostanze da parte della popolazione.

(8) È possibile dimostrare che esistono attualmente nella Comunità alcune carenze nutrizionali, per quanto non molto frequenti. Le trasformazioni nella situazione socioeconomica prevalente nella Comunità e gli stili di vita di diversi gruppi di popolazione hanno comportato fabbisogni nutrizionali differenti, nonché modifiche agli stili alimentari. Ciò, a sua volta, ha comportato cambiamenti nei fabbisogni calorici e nutrizionali dei vari gruppi di popolazione e ad assunzioni di talune vitamine e minerali per tali gruppi che sarebbero inferiori a quelle raccomandate nei vari Stati membri. In aggiunta, le conoscenze derivanti dal progresso scientifico indicano che l'assunzione di talune sostanze nutritive per il mantenimento di una salute ottimale e del benessere potrebbe essere superiore a quella attualmente raccomandata.

(9) Dovrebbe essere consentita l'aggiunta negli alimenti delle sole vitamine e dei soli minerali normalmente presenti nei cibi e quindi assunti con l'alimentazione e considerati sostanze nutritive essenziali, senza che ciò implichi che l'aggiunta degli stessi sia necessaria. Deve essere evitata ogni possibile controversia circa l'individuazione di tali sostanze nutritive essenziali. Risulta quindi opportuno elaborare un elenco positivo di tali vitamine e minerali.

(10) Le sostanze chimiche utilizzate come fonti di vitamine e minerali che possono essere integrate negli alimenti dovrebbero essere sicure e biodisponibili, vale a dire atte ad essere utilizzate dall'organismo. Per tale motivo occorre elaborare anche per queste sostanze un elenco positivo. In tale elenco dovrebbero essere riportate le sostanze approvate dal Comitato scientifico per l'alimentazione umana nel parere reso il 12 maggio 1999 sulla base dei criteri summenzionati di sicurezza e di biodisponibilità, da utilizzare nella produzione di alimenti destinati ai lattanti e alla prima infanzia, oppure di alimenti destinati ad un'alimentazione particolare o di integratori alimentari. Benché il cloruro di sodio (sale comune) non figuri tra le sostanze di tale elenco, può continuare a essere usato come ingrediente nella preparazione degli alimenti.

(11) Per tenersi al passo con il progresso scientifico e tecnologico è importante procedere tempestivamente, ove necessario, alla revisione di tali elenchi. Tali revisioni consistono in interventi di natura tecnica e la loro adozione dovrebbe essere affidata alla Commissione al fine di semplificare e accelerare la procedura.

(12) Gli alimenti cui sono aggiunte vitamine e minerali sono commercializzati nella maggior parte dei casi dai fabbricanti e possono essere percepiti dai consumatori come prodotti che presentano un vantaggio nutrizionale, fisiologico o di altro tipo per la salute rispetto a prodotti simili o altri ai quali tali sostanze non sono state aggiunte. Ciò potrebbe indurre i consumatori ad effettuare scelte che in altre circostanze sarebbero indesiderabili. Al fine di contrastare tale effetto potenziale non desiderato, si ritiene opportuno impostare alcune restrizioni ai prodotti ai quali vitamine e minerali possono essere aggiunte, oltre a quelle che deriverebbero naturalmente da considerazioni tecnologiche o che risultassero necessarie per motivi di sicurezza quando vengono fissati i tenori massimi di vitamine e minerali presenti in tali prodotti. Il tenore nei prodotti di talune sostanze, come ad esempio l'alcool, costituirebbe in questo contesto un criterio adeguato per vietare l'aggiunta di vitamine e minerali al prodotto in questione. Qualsiasi deroga al divieto di aggiungere vitamine e minerali alle bevande alcoliche dovrebbe essere limitata alla protezione delle ricette di vini tradizionali e i prodotti in questione dovrebbero essere notificati alla Commissione. Non dovrebbe essere fornita alcuna indicazione su eventuali benefici nutrizionali o per la salute. Al fine di evitare qualunque confusione nei consumatori in merito al valore nutritivo naturale degli alimenti freschi, è inoltre opportuno vietare l'aggiunta di vitamine e minerali a tali prodotti.

(13) Il presente regolamento non riguarda l'utilizzazione di vitamine e minerali in tracce come indicatori di autenticità impiegati per la lotta contro le frodi.

(14) L'assunzione eccessiva di vitamine e minerali può dar luogo a reazioni avverse per la salute e occorre, pertanto, fissarne le quantità massime che possono essere aggiunte agli alimenti, ove necessario. Tali quantità devono garantire che l'uso normale dei prodotti, nel rispetto delle istruzioni indicate dal fabbricante e nel contesto di un'alimentazione equilibrata, non comporti rischi per i consumatori. Sarebbe quindi opportuno fissare le quantità massime totali di sicurezza per le vitamine e i minerali presenti in modo naturale negli alimenti e/o aggiunti agli alimenti per qualunque finalità, compresa quella relativa ad utilizzazioni tecnologiche.

(15) Per tale motivo dette quantità massime e altre condizioni che ne limitino l'aggiunta agli alimenti dovrebbero essere adottate, ove necessario, tenendo conto dei livelli più elevati di sicurezza fissati con il metodo della valutazione scientifica del rischio in base a dati scientifici generalmente riconosciuti e della loro potenziale assunzione derivante da altri alimenti. Si dovrebbero inoltre tenere in dovuta considerazione i consumi di riferimento di vitamine e minerali da parte della popolazione. Ove sia necessario stabilire, per talune vitamine e minerali, limitazioni circa gli alimenti ai quali possono essere aggiunte (ad esempio l'aggiunta di iodio al sale), le priorità dovranno essere date alle finalità di reintegrarne il tenore, laddove esso sia stato ridotto durante le procedure di produzione, magazzinaggio o trattamento, e di dare a tali alimenti un valore nutrizionale analogo a quello degli alimenti che intendono sostituire.

fatto salvo il regolamento (CE) n. 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari (¹).

(16) Vitamine e minerali aggiunti agli alimenti dovrebbero comportare la presenza di una quantità minima nell'alimento, altrimenti la presenza di quantità troppo piccole e insignificanti in questi alimenti fortificati non arrecherebbe alcun vantaggio al consumatore e lo indurrebbe in errore. Lo stesso principio è alla base dell'esigenza secondo la quale tali sostanze nutritive dovrebbero essere presenti in quantità significativa nell'alimento al fine di poter essere menzionate nelle indicazioni nutrizionali. Sarebbe quindi opportuno che le quantità minime di vitamine e di minerali presenti negli alimenti ai quali sono stati aggiunti tali vitamine e tali minerali siano identiche alle quantità significative richieste affinché tali sostanze nutritive possano essere dichiarate nelle indicazioni nutrizionali, salvo ove diversamente previsto da opportune deroghe.

(19) Vista l'importanza nutrizionale dei prodotti a cui siano aggiunte vitamine e minerali e il loro impatto potenziale sulle abitudini alimentari e sulle assunzioni complessive di sostanze nutritive, il consumatore dovrebbe essere in grado di valutare la loro qualità nutrizionale globale. Pertanto, in deroga all'articolo 2 della direttiva 90/496/CEE del Consiglio del 24 settembre 1990 relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari (²), l'etichettatura nutrizionale dovrebbe essere obbligatoria.

(17) L'adozione di quantità massime e di condizioni di utilizzazione basate sui principi e criteri definiti nel presente regolamento e l'adozione di quantità minime dovrebbero assumere la forma di misure di applicazione di natura tecnica e dovrebbe essere affidata alla Commissione al fine di semplificare e accelerare la procedura.

(20) Una dieta normale e variata contiene molti ingredienti che a loro volta contengono numerose sostanze. L'apporto di tali sostanze o ingredienti derivante dalla loro utilizzazione normale e tradizionale nelle diete attuali non suscita alcuna preoccupazione e non deve essere regolamentato. Alcune sostanze diverse da vitamine e minerali o ingredienti che ne contengono sono aggiunte agli alimenti sotto forma di estratti o di concentrati e possono comportare apporti nettamente superiori a quelli che potrebbero essere ingeriti nel quadro di una dieta adeguata e varia. La sicurezza di tali pratiche è in alcuni casi messa seriamente in discussione e i vantaggi non sono chiari; di conseguenza, esse dovrebbero essere regolamentate. È opportuno, in questi casi, che gli operatori del settore alimentare, responsabili della sicurezza dei prodotti alimentari che immettono sul mercato, assumano l'onere della prova quanto alla sicurezza dei loro prodotti.

(18) Le disposizioni generali in materia di etichettatura e le relative definizioni sono contenute nella direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 marzo 2000 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità (³). Occorre pertanto inserire nel presente regolamento solo le disposizioni aggiuntive necessarie. Queste disposizioni complementari dovrebbero applicarsi anche

(21) Vista la natura particolare degli alimenti cui siano stati aggiunti minerali e vitamine, dovrebbero essere predisposti ulteriori mezzi oltre a quelli normalmente a disposizione delle autorità di vigilanza, per facilitare l'efficace controllo di tali prodotti.

(22) Poiché l'obiettivo del presente regolamento, ossia la garanzia dell'efficace funzionamento del mercato interno per quanto riguarda l'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti assicurando al tempo stesso un elevato livello di tutela dei consumatori, non può essere realizzato in misura sufficiente dagli Stati membri e può dunque essere realizzato meglio a livello comunitario, la Comunità può intervenire in base al principio di sussidiarietà di cui all'articolo 5 del trattato. Il presente regolamento si limita a quanto è necessario per conseguire tale scopo in ottemperanza al principio di proporzionalità enunciato nello stesso articolo.

(¹) Vedi pagina 9 della presente Gazzetta ufficiale.

(²) GU L 276 del 6.10.1990, pag. 40. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2003/120/CE della Commissione (GU L 333 del 20.12.2003, pag. 51).

(³) GU L 109 del 6.5.2000, pag. 29. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2003/89/CE (GU L 308 del 25.11.2003, pag. 15).

(23) Le misure necessarie all'attuazione del presente regolamento sono adottate secondo la decisione 1999/468/CE del Consiglio del 28 giugno 1999 recante modalità per l'esercizio delle competenze di esecuzione conferite alla Commissione (¹),

Articolo 2

Definizioni

Ai fini del presente regolamento si applicano le seguenti definizioni:

- 1) «autorità»: l'autorità europea per la sicurezza alimentare istituita dal regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare (²);
- 2) «altra sostanza»: una sostanza diversa da una vitamina o da un minerale, che ha un effetto nutrizionale o fisiologico.

CAPO I

HANNO ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

OGGETTO, CAMPO D'APPLICAZIONE E DEFINIZIONI

Articolo 1

Oggetto e campo d'applicazione

1. Il presente regolamento armonizza le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri concernenti l'aggiunta di vitamine e minerali e di talune sostanze di altro tipo agli alimenti, al fine di garantire l'efficace funzionamento del mercato interno assicurando al tempo stesso un elevato livello di tutela dei consumatori.
2. Le disposizioni del presente regolamento relative alle vitamine e ai minerali non si applicano agli integratori alimentari disciplinati dalla direttiva 2002/46/CE.
3. Il presente regolamento si applica lasciando impregiudicate le disposizioni specifiche della normativa comunitaria in materia di:
 - a) alimenti destinati a un'alimentazione particolare e, in mancanza di disposizioni specifiche, i requisiti in materia di composizione di tali prodotti resi necessari dai particolari bisogni nutrizionali delle persone cui sono destinati;
 - b) nuovi alimenti e nuovi ingredienti alimentari;
 - c) alimenti geneticamente modificati;
 - d) additivi alimentari e aromi;
 - e) pratiche e trattamenti enologici autorizzati.

(¹) GU L 184 del 17.7.1999, pag. 23.

CAPO II

AGGIUNTA DI VITAMINE E MINERALI

Articolo 3

Requisiti per l'aggiunta di vitamine e minerali

1. Solo le vitamine e/o i minerali elencati nell'allegato I, nelle forme elencate nell'allegato II, possono essere aggiunti agli alimenti, in conformità con le disposizioni del presente regolamento.

2. Vitamine e minerali nella forma biodisponibile per il corpo umano possono essere aggiunti agli alimenti, a prescindere dal fatto che siano o meno normalmente presenti in detti alimenti, per tener conto in particolare di quanto segue:

- a) carenza di una o più vitamine e/o minerali nella popolazione o in gruppi specifici di popolazione che possa essere dimostrata mediante prove cliniche o subcliniche della carenza stessa o indicata da stime di bassi livelli di assunzione di sostanze nutritive, o
- b) possibilità di migliorare lo stato nutrizionale della popolazione o di gruppi specifici di popolazione e/o compensare le eventuali carenze negli apporti dietetici di vitamine o minerali dovute a cambiamenti delle abitudini alimentari, o
- c) evoluzione di conoscenze scientifiche generalmente accettabili riguardo al ruolo nutrizionale delle vitamine e dei minerali e ai conseguenti effetti sulla salute.

3. Le modifiche degli elenchi di cui al paragrafo 1 del presente articolo sono adottate secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, tenuto conto del parere dell'autorità.

Prima di procedere a tali modifiche, la Commissione consulta le parti interessate, in particolare l'industria alimentare e le associazioni di consumatori.

(²) GU L 31 dell'1.2.2002, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 575/2006 della Commissione (GU L 100 dell'8.4.2006, pag. 3).

Articolo 4**Restrizioni all'aggiunta di vitamine e minerali**

Vitamine e minerali non possono essere aggiunti a:

- a) prodotti alimentari non trasformati, compresi, a titolo esemplificativo e non limitativo, frutta, verdura, carne, pollame e pesce;
- b) bevande con tenore alcolico superiore all'1,2 % in volume, fatta eccezione, in deroga all'articolo 3, paragrafo 2, per i prodotti:
 - i) di cui all'articolo 44, paragrafi 6 e 13 del regolamento (CE) del Consiglio n. 1493/1999 del 17 maggio 1999 relativo all'organizzazione comune del mercato vitivinicolo (¹),
 - ii) commercializzati prima dell'adozione del presente regolamento,
 - iii) che sono stati notificati alla Commissione da uno Stato membro in conformità dell'articolo 11,

e a condizione che non vi siano indicazioni a carattere nutrizionale o sanitario.

Gli altri alimenti o le categorie di alimenti cui non si possono aggiungere particolari vitamine e minerali possono essere determinati secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, alla luce di prove scientifiche e considerando il valore nutrizionale.

Articolo 5**Criteri di purezza**

1. I criteri di purezza per le formule vitameriche e le sostanze minerali elencate nell'allegato II sono adottati secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, tranne quando si applicano ai sensi del paragrafo 2 del presente articolo.

2. Per quanto riguarda le formule vitameriche e le sostanze minerali elencate nell'allegato II si applicano i criteri di purezza prescritti dalla normativa comunitaria per l'utilizzo di tali sostanze nella produzione di prodotti alimentari a fini diversi da quelli contemplati dal presente regolamento.

3. Per quanto riguarda le formule vitameriche e le sostanze minerali elencate nell'allegato II per le quali la normativa comunitaria non prescrive criteri di purezza si applicano, fino all'adozione di tali prescrizioni, i criteri di purezza generalmente accet-

tabili raccomandati da organismi internazionali e possono essere mantenute norme nazionali che stabiliscono criteri di purezza più severi.

Articolo 6**Condizioni per l'aggiunta di vitamine e minerali**

1. Quando una vitamina o un minerale sono aggiunti agli alimenti, la quantità totale della vitamina o del minerale presenti, per qualunque scopo, nell'alimento venduto non supera le quantità massime fissate secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2. La Commissione presenta a tal fine proposte concernenti le quantità massime entro il 19 gennaio 2009. Per i prodotti concentrati e disidratati le quantità massime fissate sono quelle presenti negli alimenti preparati per il consumo in base alle istruzioni fornite dal produttore.

2. Eventuali condizioni che limitino o vietino l'aggiunta di una vitamina o un minerale specifico ad un alimento o ad una categoria di alimenti sono adottate secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2.

3. Le quantità massime di cui al paragrafo 1 e le condizioni di cui al paragrafo 2 sono stabilite prendendo in considerazione:

- a) i livelli più elevati di sicurezza stabiliti per le vitamine e i minerali in seguito ad una valutazione scientifica dei rischi basata su dati scientifici generalmente riconosciuti, tenendo conto, se del caso, dei livelli differenti di sensibilità dei diversi gruppi di consumatori;
- b) l'apporto di vitamine e minerali da altre fonti alimentari.

4. Nello stabilire le quantità massime di cui al paragrafo 1 e le condizioni di cui al paragrafo 2, si tiene debitamente conto anche delle assunzioni di riferimento di vitamine e minerali per la popolazione.

5. Nello stabilire le quantità massime di cui al paragrafo 1 e le condizioni di cui al paragrafo 2, per vitamine e minerali le cui assunzioni di riferimento per la popolazione sono prossime ai livelli più elevati di sicurezza, si prende in considerazione, ove necessario, anche quanto segue:

- a) contributo di singoli prodotti al regime alimentare globale della popolazione in generale o di sottogruppi di popolazione;
- b) profilo nutrizionale del prodotto, stabilito in base alle disposizioni del regolamento (CE) n. 1924/2006.

(¹) GU L 179 del 14.7.1999, pag. 1. Regolamento modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 2165/2005 (GU L 345 del 28.12.2005, pag. 1).

6. L'aggiunta di una vitamina o di un minerale all'alimento risulta nella presenza della vitamina o del minerale in questione nell'alimento almeno in una quantità significativa, ove definita, in conformità dell'allegato della direttiva 90/496/CEE. Le quantità minime, comprese eventuali quantità inferiori, per specifici alimenti o categorie di alimenti, sono adottate, in deroga alle quantità significative sopra menzionate secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2.

CAPO III

AGGIUNTA DI TALUNE SOSTANZE DI ALTRO TIPO

Articolo 8

Articolo 7

Sostanze vietate, soggette a restrizioni, o sottoposte alla sorveglianza della Comunità

Etichettatura, presentazione e pubblicità

1. Nell'etichettatura, nella presentazione e nella pubblicità degli alimenti ai quali siano stati aggiunti vitamine e minerali non figurano diciture che affermino o sottintendano che una dieta equilibrata e variata non è in grado di apportare adeguate quantità di sostanze nutritive. Ove opportuno, una deroga riguardante una specifica sostanza nutritiva può essere adottata secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2.

2. L'etichettatura, la presentazione e la pubblicità degli alimenti ai quali siano stati aggiunti vitamine e minerali non traggono in errore o ingannano il consumatore riguardo al valore nutrizionale dell'alimento che può risultare dall'aggiunta di tali sostanze nutritive.

3. L'etichettatura nutrizionale dei prodotti ai quali siano stati aggiunti vitamine e minerali e che sono disciplinati dal presente regolamento è obbligatoria. Le informazioni da fornire consistono in quanto specificato all'articolo 4, paragrafo 1, gruppo 2, della direttiva 90/496/CEE e nelle quantità totali di vitamine e minerali qualora essi siano aggiunti all'alimento.

4. L'etichettatura dei prodotti ai quali sono stati aggiunti vitamine e minerali può contenere una dicitura che indichi tale aggiunta alle condizioni di cui al regolamento (CE) n. 1924/2006.

5. Il presente articolo si applica fatte salve le altre disposizioni della normativa sugli alimenti applicabili a categorie specifiche di alimenti.

6. Le modalità di attuazione del presente articolo possono essere precise secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2.

1. Si segue la procedura di cui al presente articolo qualora una sostanza diversa dalle vitamine o dai minerali, o un ingrediente contenente una sostanza, diversa dalle vitamine o dai minerali, siano aggiunti agli alimenti o utilizzati nella produzione di alimenti in condizioni tali da comportare l'ingestione di quantità di tale sostanza ampiamente superiori a quelle che ci si può ragionevolmente aspettare di assumere in condizioni normali di consumo nell'ambito di una dieta equilibrata e varia, e/o tali da rappresentare altrimenti un rischio potenziale per i consumatori.

2. La Commissione, di propria iniziativa o sulla base di informazioni fornite dagli Stati membri, può prendere una decisione secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, dopo che, in ogni singolo caso, l'Autorità ha valutato le informazioni disponibili, al fine di includere, se necessario, la sostanza o l'ingrediente di cui all'allegato III. In particolare:

a) qualora siano individuati effetti nocivi per la salute, la sostanza e/o l'ingrediente contenente la sostanza, sono:

i) inseriti nell'allegato III, parte A e la loro aggiunta agli alimenti o la loro utilizzazione nella produzione di alimenti sono vietate; oppure

ii) inseriti nell'allegato III, parte B e la loro aggiunta agli alimenti o la loro utilizzazione nella produzione di alimenti sono consentite solo alle condizioni ivi specificate;

b) qualora sia individuata la possibilità di effetti nocivi per la salute ma l'incertezza scientifica persista, la sostanza è inserita nell'allegato III, parte C.

3. Le disposizioni comunitarie applicabili ad alimenti specifici possono contemplare restrizioni o divieti, in aggiunta a quelle contemplate nel presente regolamento, circa l'utilizzazione di talune sostanze.

4. Gli operatori del settore alimentare, o qualsiasi altra parte interessata, possono presentare in qualsiasi momento all'Autorità, perché lo valuti, un fascicolo che riporta i dati scientifici che dimostrano la sicurezza di una sostanza di cui all'allegato III, parte C, così come utilizzata in un alimento o in una categoria di alimenti e che illustra la finalità di tale utilizzazione. L'Autorità informa al più presto gli Stati membri e la Commissione di tale presentazione e mette il fascicolo a loro disposizione.

5. Entro quattro anni dalla data in cui una sostanza è stata inserita nell'elenco dell'allegato III, parte C, è adottata una decisione secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2 e tenendo in considerazione il parere dell'Autorità sugli eventuali fascicoli presentati a fini di valutazione, di cui al paragrafo 4 del presente articolo, in base alla quale si consente l'utilizzazione generalizzata di una sostanza inserita nell'allegato III, parte C oppure si inserisce tale sostanza nell'allegato III, parte A o B, a seconda del caso.

6. La Commissione stabilisce, secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, le norme di attuazione per l'applicazione del presente articolo, comprese le norme relative alla presentazione di cui al paragrafo 4 del presente articolo.

- f) le sostanze per le quali è stato presentato un fascicolo secondo quanto previsto all'articolo 17, paragrafo 1, lettera b);
- g) le informazioni sulle sostanze inserite nell'allegato III e sui motivi del loro inserimento;
- h) le informazioni sulle sostanze elencate nell'allegato III, Parte C, il cui uso è di norma consentito ai sensi dell'articolo 8, paragrafo 5.

3. Il registro è accessibile al pubblico.

Articolo 10

Libera circolazione delle merci

Fermo restando quanto disposto dal trattato, in particolare agli articoli 28 e 30, gli Stati membri non possono limitare o vietare il commercio di alimenti che siano conformi a quanto disposto nel presente regolamento e negli atti comunitari adottati per la sua esecuzione attraverso l'applicazione di disposizioni nazionali non armonizzate che regolino l'aggiunta di vitamine e minerali agli alimenti.

Articolo 11

Disposizioni nazionali

1. Entro il 19 luglio 2007 gli Stati membri informano la Commissione in merito alle vigenti disposizioni nazionali in materia di aggiunta obbligatoria di vitamine e minerali e di prodotti di cui alla deroga prevista dall'articolo 4, lettera b).

2. Se uno Stato membro, in mancanza di disposizioni comunitarie, ritiene necessario adottare una nuova disposizione legislativa:

- a) sull'aggiunta obbligatoria di vitamine o minerali a determinati alimenti o categorie di alimenti; oppure
- b) sul divieto o la restrizione dell'utilizzo di talune sostanze di altro tipo nella produzione di determinati alimenti;

la notifica alla Commissione secondo la procedura di cui all'articolo 12.

Articolo 12

Procedura di notifica

1. Se uno Stato membro ritiene necessario adottare una nuova disposizione legislativa notifica alla Commissione e agli altri Stati membri le misure previste, indicando i motivi che le giustificano.

2. La Commissione consulta il Comitato di cui all'articolo 14, paragrafo 1, se ritiene che tale consultazione sia utile, o se uno Stato membro lo richiede, ed emette un parere sulle misure previste.

CAPO IV

DISPOSIZIONI GENERALI E FINALI

Articolo 9

Registro comunitario

1. La Commissione istituisce e tiene aggiornato un registro comunitario sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune sostanze di altro tipo agli alimenti, in seguito denominato «il registro».

2. Sul registro figura quanto segue:

- a) le vitamine e i minerali, elencati nell'allegato I, che possono essere aggiunti agli alimenti;
- b) le formule vitamiche e le sostanze minerali, elencate nell'allegato II, che possono essere aggiunte agli alimenti;
- c) le quantità massime e minime di vitamine e di minerali che possono essere aggiunte agli alimenti e le condizioni correlate fissate in conformità dell'articolo 6;
- d) le informazioni relative alle disposizioni nazionali in materia di aggiunta obbligatoria di vitamine e minerali di cui all'articolo 11;
- e) eventuali restrizioni all'aggiunta di vitamine e minerali ai sensi dell'articolo 4;

3. Lo Stato membro interessato può adottare le misure previste soltanto sei mesi dopo la notifica di cui al paragrafo 1 e purché non abbia ricevuto parere negativo dalla Commissione.

Se il parere è negativo la Commissione determina, secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2 e prima dello scadere del termine di cui al primo comma del presente paragrafo, se le misure previste possono essere attuale. La Commissione può chiedere che siano apportate alcune modifiche alle misure previste.

Articolo 13

Misure di salvaguardia

1. Uno Stato membro, se ha seri motivi per ritenere che un prodotto, pur essendo conforme alle disposizioni del presente regolamento, ponga in pericolo la salute umana, può temporaneamente sospendere o limitare l'applicazione delle disposizioni in questione nel proprio territorio.

Esso ne informa immediatamente gli altri Stati membri e la Commissione, motivando la sua decisione.

2. La decisione è adottata secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2, eventualmente dopo aver ottenuto un parere dall'Autorità.

La Commissione può avviare tale procedura di propria iniziativa.

3. Lo Stato membro di cui al paragrafo 1 può mantenere la sospensione o la limitazione sino al momento in cui non gli sia stata notificata la decisione di cui al paragrafo 2.

Articolo 14

Procedura del comitato

1. La Commissione è assistita dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali istituito dall'articolo 58, paragrafo 1, del regolamento (CE) n. 178/2002, in seguito denominato il «comitato».

2. Nei casi in cui è fatto riferimento al presente paragrafo si applicano gli articoli 5 e 7 della decisione 1999/468/CE, tenendo conto delle disposizioni dell'articolo 8 della stessa.

Il periodo di cui all'articolo 5, paragrafo 6 della decisione 1999/468/CE è fissato a tre mesi.

3. Il comitato adotta il proprio regolamento interno.

Articolo 15

Monitoraggio

Per agevolare un monitoraggio efficace degli alimenti ai quali sono stati aggiunti minerali e vitamine, e degli alimenti contenenti sostanze elencate nell'allegato III, parti B e C, gli Stati membri possono prescrivere che il produttore o il responsabile dell'immissione in commercio di tali alimenti nel loro territorio notifichi all'autorità competente tale immissione in commercio fornendo un campione dell'etichetta utilizzata per il prodotto. In tal caso possono anche essere richieste informazioni sul ritiro del prodotto dal mercato.

Articolo 16

Valutazione

Entro il 1º luglio 2013, la Commissione presenta al Parlamento europeo e al Consiglio una relazione circa gli effetti dell'attuazione del presente regolamento, in particolare per quanto riguarda l'evoluzione del mercato degli alimenti ai quali sono stati aggiunti minerali e vitamine, il loro consumo, le assunzioni di sostanze nutritive per la popolazione e le trasformazioni nelle abitudini alimentari, l'aggiunta di talune altre sostanze, corredata di eventuali proposte di modifica del presente regolamento che la Commissione ritenga necessarie. In tale contesto gli Stati membri forniscono le necessarie informazioni pertinenti alla Commissione entro il 1º luglio 2012. Le regole dettagliate per l'applicazione del presente articolo sono precise secondo la procedura di cui all'articolo 14, paragrafo 2.

Articolo 17

Misure transitorie

1. In deroga all'articolo 3, paragrafo 1 e fino al 19 gennaio 2014, gli Stati membri possono consentire sul loro territorio l'utilizzazione di vitamine e minerali non elencati nell'allegato I o in forme non elencate nell'allegato II purché:

a) la sostanza in questione sia utilizzata in aggiunta ad alimenti commercializzati nella Comunità al 19 gennaio 2007, e

b) l'Autorità non abbia espresso un parere sfavorevole circa l'utilizzazione della sostanza, o la sua utilizzazione in quella forma, nella produzione di alimenti, sulla base di un fascicolo relativo all'utilizzazione della sostanza in questione che lo Stato membro deve presentare alla Commissione entro il 19 gennaio 2010.

2. Fino al 19 gennaio 2014, gli Stati membri possono continuare ad applicare, conformemente alle norme del trattato, le limitazioni o i divieti nazionali in vigore per quanto riguarda il commercio di alimenti cui sono state aggiunte vitamine e minerali non elencati nell'allegato I o nelle forme non elencate nell'allegato II.

3. Gli Stati membri possono continuare ad applicare, conformemente alle norme del trattato, le disposizioni nazionali in vigore per quanto riguarda le quantità massime e minime di vitamine e minerali elencati nell'allegato I che sono aggiunti agli alimenti e le condizioni applicabili all'aggiunta, fino all'adozione

di misure comunitarie corrispondenti a norma dell'articolo 6 o in virtù di altre specifiche disposizioni comunitarie.

Articolo 18

Entrata in vigore

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 1º luglio 2007.

I prodotti immessi in commercio o etichettati prima del 1º luglio 2007 che non sono conformi alle disposizioni del presente regolamento possono essere commercializzati fino alla vendita di tutti gli stock, ma non più tardi del 31 dicembre 2009.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, addì 20 dicembre 2006.

Per il Parlamento europeo

Il presidente

J. Borrell FONTELLS

Per il Consiglio

Il presidente

J. KORKEAOJA

ALLEGATO I

VITAMINE E MINERALI CHE POSSONO ESSERE AGGIUNTI AGLI ALIMENTI

1. Vitamine

Vitamina A	Calcio
Vitamina D	Magnesio
Vitamina E	Ferro
Vitamina K	Rame
Vitamina B1	Iodio
Vitamina B2	Zinco
Niacina	Manganese
Acido pantotenico	Sodio
Vitamina B6	Potassio
Acido folico	Selenio
Vitamina B12	Cromo
Biotina	Molibdeno
Vitamina C	Fluoruro
	Cloruro
	Fosforo

2. Minerali

ALLEGATO II

FORMULE VITAMINICHE E SOSTANZE MINERALI CHE POSSONO ESSERE AGGIUNTE AGLI ALIMENTI

1. Formule vitaminiche

VITAMINA A	VITAMINA B12
retinolo	cianocobalamina
acetato di retinile	idrossocobalamina
palmitato di retinile	BIOTINA
beta-carotene	D-biotina
VITAMINA D	VITAMINA C
colecalciferolo	acido L-ascorbico
ergocalciferolo	L-ascorbato di sodio
VITAMINA E	L-ascorbato di calcio
D-alfa-tocoferolo	L-ascorbato di potassio
DL-alfa-tocoferolo	6-palmitato di L-ascorbile
acetato di D-alfa-tocoferile	2. Sostanze minerali
acetato di DL-alfa-tocoferile	carbonato di calcio
succinato acido di D-alfa-tocoferile	cloruro di calcio
VITAMINA K	sali di calcio dell'acido citrico
fillochinone (fitomenadione)	gluconato di calcio
VITAMINA B1	glicerofosfato di calcio
cloridrato di tiamina	lattato di calcio
mononitratato di tiamina	sali di calcio dell'acido ortofosforico
VITAMINA B2	idrossido di calcio
riboflavina	ossido di calcio
riboflavina 5'-fosfato, sodio	solfato di calcio
NIACINA	acetato di magnesio
acido nicotinico	carbonato di magnesio
nicotinamide	cloruro di magnesio
ACIDO PANTOTENICO	sali di magnesio dell'acido citrico
D-pantotenato, calcio	gluconato di magnesio
D-pantotenato, sodio	glicerofosfato di magnesio
dexpantenolo	sali di magnesio dell'acido ortofosforico
VITAMINA B6	lattato di magnesio
cloridrato di piridossina	idrossido di magnesio
piridossina-5'-fosfato	ossido di magnesio
dipalmitato di piridossina	solfato di magnesio
ACIDO FOLICO	carbonato ferroso
acido pteroil-monoglutammico	citato ferroso
	citato ferrico di ammonio
	gluconato ferroso
	fumarato ferroso
	difosfato ferrico di sodio

lattato feroso	solfato di manganese
solfato feroso	bicarbonato di sodio
difosfato ferrico (pirofosfato ferrico)	carbonato di sodio
saccarato ferrico	citato di sodio
ferro elementare (carbonile+elettrolitico+ riduzione con idrogeno)	gluconato di sodio
carbonato rameico	lattato di sodio
citato rameico	idrossido di sodio
gluconato rameico	sali di sodio dell'acido ortofosforico
solfato rameico	seleniato di sodio
complesso rame-lisina	selenito acido di sodio
ioduro di potassio	selenuro di sodio
iodato di potassio	fluoruro di sodio
ioduro di sodio	fluoruro di potassio
iodato di sodio	bicarbonato di potassio
acetato di zinco	carbonato di potassio
cloruro di zinco	cloruro di potassio
citato di zinco	citato di potassio
gluconato di zinco	gluconato di potassio
lattato di zinco	glicerofosfato di potassio
ossido di zinco	lattato di potassio
carbonato di zinco	idrossido di potassio
solfato di zinco	sali di potassio dell'acido ortofosforico
carbonato di manganese	cloruro di cromo (III) e il suo esaidrato
cloruro di manganese	solfato di cromo (III) e il suo esaidrato
citato di manganese	molibdato di ammonio (molibdeno (VI))
gluconato di manganese	molibdato di sodio (molibdeno (VI))
glicerofosfato di manganese	

ALLEGATO III

**SOSTANZE IL CUI IMPIEGO NEGLI ALIMENTI È VIETATO, SOGGETTO A RESTRIZIONI O SOTTOPOSTO
ALLA SORVEGLIANZA DELLA COMUNITÀ**

Parte A — Sostanze vietate

Parte B — Sostanze soggette a restrizioni

Parte C — Sostanze sottoposte alla sorveglianza della Comunità

Allegato II



FEDERAL REGISTER

Vol. 81 Friday,
No. 103 May 27, 2016

Pages 33581–34240

OFFICE OF THE FEDERAL REGISTER



The **FEDERAL REGISTER** (ISSN 0097-6326) is published daily, Monday through Friday, except official holidays, by the Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration, Washington, DC 20408, under the Federal Register Act (44 U.S.C. Ch. 15) and the regulations of the Administrative Committee of the Federal Register (1 CFR Ch. I). The Superintendent of Documents, U.S. Government Publishing Office, Washington, DC 20402 is the exclusive distributor of the official edition. Periodicals postage is paid at Washington, DC.

The **FEDERAL REGISTER** provides a uniform system for making available to the public regulations and legal notices issued by Federal agencies. These include Presidential proclamations and Executive Orders, Federal agency documents having general applicability and legal effect, documents required to be published by act of Congress, and other Federal agency documents of public interest.

Documents are on file for public inspection in the Office of the Federal Register the day before they are published, unless the issuing agency requests earlier filing. For a list of documents currently on file for public inspection, see www.ofr.gov.

The seal of the National Archives and Records Administration authenticates the **Federal Register** as the official serial publication established under the Federal Register Act. Under 44 U.S.C. 1507, the contents of the **Federal Register** shall be judicially noticed.

The **Federal Register** is published in paper and on 24x microfiche. It is also available online at no charge at www.fdsys.gov, a service of the U.S. Government Publishing Office.

The online edition of the **Federal Register** is issued under the authority of the Administrative Committee of the Federal Register as the official legal equivalent of the paper and microfiche editions (44 U.S.C. 4101 and 1 CFR 5.10). It is updated by 6:00 a.m. each day the **Federal Register** is published and includes both text and graphics from Volume 59, 1 (January 2, 1994) forward. For more information, contact the GPO Customer Contact Center, U.S. Government Publishing Office. Phone 202-512-1800 or 866-512-1800 (toll free). E-mail, gocusthelp.com.

The annual subscription price for the **Federal Register** paper edition is \$749 plus postage, or \$808, plus postage, for a combined **Federal Register**, **Federal Register** Index and List of CFR Sections Affected (LSA) subscription; the microfiche edition of the **Federal Register** including the **Federal Register** Index and LSA is \$165, plus postage. Six month subscriptions are available for one-half the annual rate. The prevailing postal rates will be applied to orders according to the delivery method requested. The price of a single copy of the daily **Federal Register**, including postage, is based on the number of pages: \$11 for an issue containing less than 200 pages; \$22 for an issue containing 200 to 400 pages; and \$33 for an issue containing more than 400 pages. Single issues of the microfiche edition may be purchased for \$3 per copy, including postage. Remit check or money order, made payable to the Superintendent of Documents, or charge to your GPO Deposit Account, VISA, MasterCard, American Express, or Discover. Mail to: U.S. Government Publishing Office—New Orders, P.O. Box 979050, St. Louis, MO 63197-9000; or call toll free 1-866-512-1800, DC area 202-512-1800; or go to the U.S. Government Online Bookstore site, see bookstore.gpo.gov.

There are no restrictions on the republication of material appearing in the **Federal Register**.

How To Cite This Publication: Use the volume number and the page number. Example: 81 FR 12345.

Postmaster: Send address changes to the Superintendent of Documents, Federal Register, U.S. Government Publishing Office, Washington, DC 20402, along with the entire mailing label from the last issue received.

SUBSCRIPTIONS AND COPIES

PUBLIC

Subscriptions:

Paper or fiche	202-512-1800
Assistance with public subscriptions	202-512-1806

General online information

202-512-1530; 1-888-293-6498

Single copies/back copies:

Paper or fiche	202-512-1800
Assistance with public single copies	1-866-512-1800 (Toll-Free)

FEDERAL AGENCIES

Subscriptions:

Assistance with Federal agency subscriptions:

Email	FRSubscriptions@nara.gov
Phone	202-741-6000



Printed on recycled paper.

Nutrient	Unit of measure	RDI			
		Adults and children ≥ 4 years	Infants ¹ through 12 months	Children 1 through 3 years	Pregnant women and lactating women
Vitamin A	Micrograms RAE ² (mcg)	900	500	300	1,300
Vitamin C	Milligrams (mg)	90	50	15	120
Calcium	Milligrams (mg)	1,300	260	700	1,300
Iron	Milligrams (mg)	18	11	7	27
Vitamin D	Micrograms (mcg) ³	20	10	15	15
Vitamin E	Milligrams (mg) ⁴	15	5	6	19
Vitamin K	Micrograms (mcg)	120	2.5	30	90
Thiamin	Milligrams (mg)	1.2	0.3	0.5	1.4
Riboflavin	Milligrams (mg)	1.3	0.4	0.5	1.6
Niacin	Milligrams NE ⁵ (mg)	16	4	6	18
Vitamin B ₆	Milligrams (mg)	1.7	0.3	0.5	2.0
Folate ⁶	Micrograms DFE ⁷ (mcg)	400	80	150	600
Vitamin B ₁₂	Micrograms (mcg)	2.4	0.5	0.9	2.8
Biotin	Micrograms (mcg)	30	6	8	35
Pantothenic acid	Milligrams (mg)	5	1.8	2	7
Phosphorus	Milligrams (mg)	1,250	275	460	1,250
Iodine	Micrograms (mcg)	150	130	90	290
Magnesium	Milligrams (mg)	420	75	80	400
Zinc	Milligrams (mg)	11	3	3	13
Selenium	Micrograms (mcg)	55	20	20	70
Copper	Milligrams (mg)	0.9	0.2	0.3	1.3
Manganese	Milligrams (mg)	2.3	0.6	1.2	2.6
Chromium	Micrograms (mcg)	35	5.5	11	45
Molybdenum	Micrograms (mcg)	45	3	17	50
Chloride	Milligrams (mg)	2,300	570	1,500	2,300
Potassium	Milligrams (mg)	4,700	700	3,000	5,100
Choline	Milligrams (mg)	550	150	200	550
Protein	Grams (g)	N/A	11	N/A	⁸ 71

¹ RDIs are based on dietary reference intake recommendations for infants through 12 months of age.

² RAE = Retinol activity equivalents; 1 microgram RAE = 1 microgram retinol, 2 microgram supplemental β -carotene, 12 micrograms β -carotene, or 24 micrograms α -carotene, or 24 micrograms β -cryptoxanthin.

³ The amount of vitamin D may, but is not required to, be expressed in international units (IU), in addition to the mandatory declaration in mcg. Any declaration of the amount of vitamin D in IU must appear in parentheses after the declaration of the amount of vitamin D in mcg.

⁴ 1 mg α -tocopherol (label claim) = 1 mg α -tocopherol = 1 mg RRR- α -tocopherol = 2 mg all rac- α -tocopherol.

⁵ NE = Niacin equivalents, 1 mg NE = 1 mg niacin = 60 milligrams tryptophan.

⁶ "Folate" and "Folic Acid" must be used for purposes of declaration in the labeling of conventional foods and dietary supplements. The declaration for folate must be in mcg DFE (when expressed as a quantitative amount by weight in a conventional food or a dietary supplement), and percent DV based on folate in mcg DFE. Folate may be expressed as a percent DV in conventional foods. When folic acid is added or when a claim is made about the nutrient, folic acid must be declared in parentheses, as mcg of folic acid.

⁷ DFE = Dietary Folate Equivalents; 1 DFE = 1 mcg naturally-occurring folate = 0.6 mcg folic acid.

⁸ Based on the reference caloric intake of 2,000 calories for adults and children aged 4 years and older, and for pregnant women and lactating women.



Lycored BIO.
P.O.B 320
Beer Sheva 8410202, Israel
Tel: +972 732327300
Fax: +972 8 6236310
www.lycored.com

DATA SHEET

Version: 17

Date: June 2018

Product:
CapsuDar® D₃ 100 E

Catalogue:
08130

Description: Microencapsulated Cholecalciferol (vitamin D₃).

Ingredients: Cholecalciferol (vitamin D₃), maltodextrin, ethyl cellulose (E462) Tocopherols rich extract (E306), Medium Chain Triglycerides (MCT).

Specifications Physical and Chemical:

Appearance:	fine, white free flowing powder.	
Particle size:	NLT 98% < 1000 micron (18 mesh)	method M-19.103
Loss on drying:	Max 8%	method M-19.085
Vitamin D ₃ content:	min 0.25% (100,000 IU/g)	method M-19.165
Bulk density:	~0.55 g/ml	method M-19.023
Solubility:	Not soluble in water	

Heavy metals

Lead:	≤3 ppm	(ICP)
Cadmium:	≤1 ppm	(ICP)
Mercury:	≤0.1 ppm	(ICP, DMA)
Arsenic:	≤1 ppm	(ICP)

Microbiological specification: (USP <2021> and <2022>)

Total plate count:	< 1000 CFU/g
Yeast/Mold	< 100 CFU/g
E. Coli:	Absent in 10 g
Staph Aurous:	Absent in 10 g
Salmonella:	Absent in 10 g

Stability and Storage: Two years stability when stored dry below 15°C and in the original packaging. Once opened use as soon as possible.

Packing: 15kg in a closed polyethylene bag within heat sealed aluminum laminated bag and packed in cardboard boxes.

Applications: Enrichment of food in dry premixes or with low water content, e.g., cereals, nutritional bars, soups, vitamin tablets, mixing of dry incompatible ingredients.

Processing: The material should be used as powder. It can be dispersed in water. Using continues agitation. The material should not be crushed or milled before or during processing as it might break the microcapsules.

Regulation: All ingredients are certified Kosher and Halal and are food quality materials and are approved by USA FDA and European authorities. ISO 9001 and ISO 22000, FSSC (HACCP) certificates, Israeli Ministry of Health GMP permit. The product is not made from raw material of animal source and is suitable for vegetarians.



Lycored SRL
Rheinweg 4, 8200 Schaffhausen, Switzerland.
Telephone: +41 (0) 52 630 04 60
www.lycored.com infos@lycored.com

DATA SHEET

Version: 11

Date: February 2018

Product:

CapsuDar® D₃ 100 CWS

Catalogue no:

08160

Description: A spray dry food grade, cold water dispersible, free flowing powder of vitamin D₃.

Ingredients: Vitamin D₃, modified starches (E1450), sugar, Medium Chain Triglycerides, natural mixed Tocopherols (E306),

Specifications Physical and Chemical:

Appearance: free flowing white to off white powder

Particle size: between 10- 350 µm

d₉₀ ≤ 150 µm

LSC

Loss on drying: 4 % (max)

USP<731>

Vitamin D3 content: ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ ☐

HPLC

Heavy metals:

as Pb < 10 ppm (USP, <231>)

Cd < 0.4 ppm (ICP)

As < 0.5 ppm (ICP)

Hg < 0.1 ppm (DMA)

Pb < 1 ppm (ICP)

Al < 5 ppm (ICP)

Microbiological specification:

Total plate count: < 1000 CFU/g mod. § 64LFGB L.00.00-88

Yeasts &Molds: < 100 CFU/g mod. § 64 LFGB .01.00-37

E. Coli Negative in 10 g mod. § 64 LFGB L.01.00-54

Staph Aureus Negative in 1 g mod. § 64 L.02.07-2

Salmonella: Negative in 2x25 g mod. § 64 LFGB L.00.00-20

Enterobacteria Negative in 1g ISO 21528

E. Sakazakii Negative in 25 g ISO/TS 22964

Stability and: Stable for 1 year when stored in dry place below 15°C and in the

Storage original packaging. Once opened use as soon as possible.

Packaging 20 kg in aluminum laminate bags in cardboard boxes.

Application: As food additive in powders and drinks. Excellent performance in dry mixes

Processing The material should be used as powder. It can be dispersed in water to form a hazy solution.

Regulation: All ingredients are certified Kosher and Halal and are food quality materials and are approved by USA FDA and European authorities. ISO 9001 and ISO 22000, FSSC (HACCP) certificates, Israeli Ministry of Health GMP permit. The product is not made from raw material of animal source and is suitable for vegetarians